



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2011

**Susana Filipa Alves
Silva**

**Interferência com a mitose por siRNAs contidos em
nanopartículas**



**Susana Filipa Alves
Silva**

**Interferência com a mitose por siRNAs contidos em
nanopartículas**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Hassan Bousbaa, Professor Associado do Instituto Superior de Ciências da Saúde do Norte (ISCS-N) - CESPU, e coorientação da Professora Doutora Sandra Rebelo, Professora Auxiliar Convidada da Secção Autónoma de Ciências da Saúde da Universidade de Aveiro.

Dedico esta dissertação de mestrado aos meus pais e irmãos, que sempre me apoiaram em todas as etapas da minha vida, e a ti Nuno, por conseguirmos superar mais esta etapa das nossas vidas.

o júri

presidente

Professora Doutora Maria do Céu Gomes dos Santos

Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Professor Doutor João Nuno Moreira

Professor Assistente da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Professor Doutor Hassan Bousbaa

Professor Associado do Instituto Superior de Ciências da Saúde – Norte / CESPU

Professora Doutora Sandra Maria Tavares da Costa Rebelo

Professora Auxiliar convidada da Secção Autónoma de Ciências da Saúde da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Este é o culminar de uma etapa muito importante para mim, pelo que gostaria de agradecer às muitas pessoas que participaram, nas diversas formas possíveis, nesta etapa da minha formação académica:

À coordenação do CICS- Centro de Investigação em Ciências da Saúde do Instituto Superior de Ciências da Saúde - Norte / CESPU.

Ao Professor Doutor Hassan Bousbaa, pela oportunidade e pela qualidade de formação que me ofereceu durante a execução prática da minha dissertação de mestrado, e por todos os conhecimentos transmitidos.

Ao Professor Doutor Bruno Sarmento pela oportunidade que me deu na integração deste projeto, e por ter acreditado em mim e no meu trabalho.

À Professora Doutora Sandra Rebelo pela ajuda, carinho, incentivo e motivação que me incutiu.

À Diretora do mestrado em Biologia Molecular e Celular da Universidade de Aveiro, Professora Doutora Maria do Céu Gomes dos Santos.

À Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira pela disponibilidade e qualidade da formação que nos ofereceu ao longo do mestrado.

Às minhas colegas de trabalho da RADELFE por todo o apoio e disponibilidade prestadas.

Aos elementos do Grupo de Biologia Molecular e Celular (GBMC) do CICS pela atenção dispensada, pela “paciência” que tiveram, por toda a formação e informação que me transmitiram e pelos bons momentos que me proporcionaram durante este período de tempo.

De uma forma muito especial à Mestre Vanessa Nascimento por todo o apoio (técnico e pessoal) ao longo deste período. Agradeço-te por tudo o que me permitiste aprender contigo, para além das questões técnicas aprendi qual o verdadeiro significado das palavras *colaboração* e *cooperação*. Sem a tua ajuda, tudo teria sido muito mais difícil, e menos divertido, claro! Muito Obrigada.

A todos, OBRIGADA.

palavras-chave

Cancro pulmonar das não pequenas células, RNAi, siRNA, Mad2, BubR1, *checkpoint* mitótico, quitosano.

resumo

Devido à sua incidência e agressividade, o cancro do pulmão é considerado a doença oncológica mais mortal e mais frequentemente diagnosticada em todo o mundo. A toxicidade associada aos tratamentos levou a que novas estratégias terapêuticas tenham sido investigadas, entre as quais a terapia molecular alvo-dirigida, cujo alvo terapêutico é o *checkpoint* mitótico, parte integrante de um mecanismo de sobrevivência celular que assegura a correta segregação dos cromossomas na anafase, prevenindo uma iniciação prematura da segregação dos cromossomas. Dois dos “alvos” terapêuticos deste *checkpoint* são os genes que codificam para as proteínas Mad2 e BubR1, cuja repressão, pelo uso de técnicas de RNA de interferência, causa instabilidade cromossômica e leva à formação de tetraploidias e aneuploidias celulares. Devido à instabilidade e inespecificidade celular do RNA, que impossibilita a injeção direta dos oligonucleótidos de siRNA por técnicas hidrodinâmicas, o desenvolvimento de vetores para o transporte desses siRNAs é um pré-requisito para a melhoria do sucesso desta terapia. Desta forma, tem sido estudada a ligação dos siRNAs a vetores catiónicos, entre os quais, nanopartículas de quitosano, que proporcionam uma elevada efetividade e especificidade da terapêutica e reduzem os efeitos tóxicos. Face ao exposto, neste trabalho pretendeu-se interferir com a expressão dos genes das proteínas do *checkpoint* mitótico, Mad2 e BubR1, em linhas tumorais de CPNPC usando sequências de siRNA encapsuladas em nanopartículas de quitosano, de forma a verificar se o silenciamento/redução da expressão dos genes Mad2 e BubR1 interfere com a sobrevivência e proliferação dessas linhas tumorais.

Os resultados obtidos nas linhas de CPNPC mostram-nos que os siRNAs utilizados são eficientes na interferência da expressão dos genes Mad2 e BubR1, tendo-se verificado o silenciamento de ambas as proteínas nas células transfetadas, que exibem um fenótipo típico com placas metafásicas incompletas e cromossomas desalinhados; verificou-se também que o silenciamento de BubR1 não afeta tão severamente a expressão da BubR1, em comparação com o silenciamento de Mad2. Tendo em consideração o papel que ambas as proteínas desempenham no *checkpoint* mitótico, podemos concluir que as alterações verificadas ao nível da expressão poderão comprometer as suas respetivas funções e, consequentemente levar a uma segregação cromossômica incorreta, comprometendo a viabilidade e a proliferação celular e constituindo, desta forma, uma estratégia terapêutica promissora para o CPNPC.

keywords

Non-small-cell lung cancer, RNAi, siRNA Mad2, BubR1, mitotic Checkpoint, chitosan.

abstract

Because of its incidence and aggressiveness, lung cancer is considered the most deadly disease and the most often cancer diagnosed in the world. The toxicity associated with treatment led to the development of new therapeutic strategies, including the “goal-directed molecular therapy”, whose therapeutic target is the mitotic checkpoint, part of a cell survival mechanism that ensures the correct segregation of chromosomes at anaphase, preventing a premature initiation of chromosome segregation. Two of the “targets” of this therapeutic checkpoint are the genes that encode for Mad2 and BubR1 proteins, whose depression, by using RNA interference techniques, cause chromosome instability and leads to the formation of cellular tetraploidy and aneuploidy. Due to the instability and lack of specificity of cellular RNA, which prevents the direct injection of siRNA oligonucleotides by hydrodynamic techniques, development of vectors for siRNAs transport is a prerequisite for improving the success of this therapy. Thus, the binding of siRNAs to cationic vectors, including chitosan nanoparticles, has been studied, which will confer high specificity and effectiveness to the therapy and reduce its toxic effects. Given the above, this work was intended to interfere with gene expression of mitotic checkpoint proteins, Mad2 and BubR1, in NSCLC tumor cell lines using siRNA sequences encapsulated within chitosan nanoparticles in order to evaluate if the silencing/depression of Mad2 and BubR1 genes interferes with the survival and proliferation of these tumor lines.

The results obtained in NSCLC lines allow us to state that the siRNAs used are effective in interfering with the expression of both genes, Mad2 and BubR1, leading to their silencing. Transfected cells exhibit a typical phenotype with incomplete metaphase plate and misaligned chromosomes. It was also noted that the silencing of BubR1 not affect so severely the expression of BubR1 compared with silencing Mad2. Taking into account the role that both proteins play in mitotic checkpoint, we may conclude that the changes at their expression levels may compromise their respective functions and consequently lead to incorrect chromosome segregation, thus compromising cell viability and proliferation and constituting a promising therapeutic strategy for NSCLC.

Índice

Índice de Figuras.....	XVII
Índice de tabelas	XVIII
Lista de siglas e abreviaturas	XIX
Capítulo I: Introdução	1
1.1 Cancro do Pulmão	4
1.1.1 Epidemiologia do cancro do pulmão	4
1.1.2 Classificação histopatológica do cancro do pulmão	5
1.1.3 Novas opções terapêuticas para o cancro do pulmão	5
1.1.4 Silenciamento da expressão génica mediado por siRNAs.....	7
1.2 Ciclo Celular.....	10
1.2.1 Mitose	10
1.2.2 Regulação do ciclo celular	12
1.2.3 Controlo do ciclo celular	14
1.2.4 <i>Checkpoint</i> mitótico.....	15
1.2.5 Mad2.....	18
1.2.6 BubR1	19
1.3 Nanopartículas.....	20
1.4 Objetivos.....	22
Capítulo II: Metodologia Experimental.....	23
2.1 Cultura Celular	25
2.1.1 Linhas celulares e cultura celular	25
2.1.2 Condições de cultura celular	25
2.2 Tratamento de lamelas com poli- <i>L</i> -lisina	26
2.3 Determinação do índice mitótico	27
2.4 Imunofluorescência	27
2.5 RNA de interferência e transfeção de células.....	27

2.6	Extração de RNA total e sua quantificação	28
2.7	<i>Real-time Polymerase Chain Reaction</i>	29
2.7.1	<i>Design</i> dos primers	29
2.7.2	Síntese de cDNA das linhas celulares em estudo	30
2.7.3	PCR quantitativo em tempo real	30
2.8	Ensaio de MTT	31
2.9	Aquisição e tratamento de imagens	31
Capítulo III: Resultados e Discussão		33
3.1	Validação dos oligonucleótidos siMad2 e siBubR1 na linha celular HeLa	35
3.2	Interferência na expressão dos genes Mad2 e BubR1 em células de CPNPC.	38
3.2.1	Eficiência da depleção das proteínas Mad2 e BubR1 em células de CPNPC	38
3.2.2	Análise do fenótipo celular resultante da depleção das proteínas Mad2 e BubR1 por RNAi	43
3.3	Estudos de viabilidade / proliferação das células após silenciamento de Mad2 e BubR1	44
3.4	Eficiência do checkpoint mitótico nas linhas celulares de CPNPC	48
Capítulo IV: Conclusão		51
Capítulo V: Perspetivas Futuras		55
Capítulo VII: Bibliografia.....		59

Índice de Figuras

Figura 1: Tipos de cancro mais frequentes em Portugal, em ambos os sexos, no ano 2008.....	4
Figura 2: Via de sinalização do EGFR.....	6
Figura 3: Mecanismo de silenciamento da expressão génica mediada por siRNAs.....	8
Figura 4: Esquema ilustrativo dos passos envolvidos na entrega de siRNA ao pulmão ..	9
Figura 5: Esquema do ciclo celular em eucariotas	10
Figura 6: Representação esquemática das várias etapas mitóticas em células eucariotas.	12
Figura 7: Representação esquemática da atividade dos complexos ciclinas-Cdks nas diferentes fases do ciclo celular.....	13
Figura 8: Mecanismo molecular da sinalização do <i>checkpoint mitótico</i>	17
Figura 9: Modelo Mad2 <i>template</i>	18
Figura 10: Estrutura do quitosano	21
Figura 11: Fenótipo celular resultante da depleção das proteínas Mad2 e BubR1 por RNAi, em células HeLa.	36
Figura 12: Eficiência da depleção das proteínas Mad2 e BubR1 em células HeLa, por RNAi.	38
Figura 13: Depleção das proteínas Mad2 e BubR1 por RNAi, em células A549.....	39
Figura 14: Depleção das proteínas Mad2 e BubR1 por RNAi, em células H460.....	40
Figura 15: Eficiência da depleção da proteína Mad2 em células de CPNPC (A549 e H460), por RNAi.....	42
Figura 16: Eficiência da depleção da proteína BubR1 em células de CPNPC (A549 e H460), por RNAi.....	42
Figura 17: Fenótipo celular resultante da depleção das proteínas Mad2 e BubR1 por RNAi, em células A549	43
Figura 18: Fenótipo celular resultante da depleção das proteínas Mad2 e BubR1 por RNAi, em células H460.	44
Figura 19: Efeito da exposição do siMad2 na redução do MTT pelas linhas HeLa, A549 e H460.	46

Figura 20: Efeito da exposição do siBubR1 na redução do MTT pelas linhas HeLa, A549 e H460.	47
--	----

Figura 21: Efeito do nocodazole em culturas celulares, ao longo de 16h de incubação.	49
---	----

Índice de tabelas

Tabela 1: Sequências oligonucleotídicas dos <i>primers</i> utilizados em qRT-PCR para a amplificação dos genes de GAPDH, Mad2 e BubR1.....	30
--	----

Lista de siglas e abreviaturas

ACS	Sociedade Americana de Cancro;
APC/C	Complexo promotor da anafase / ciclossoma;
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> ;
Bub	<i>Budding uninhibited by benzimidazole</i> ;
BubR1	<i>Bub1 related protein</i> ;
CAK	Cinases ativadoras de ciclinas;
Cdc	<i>Cell division cycle protein</i> ;
CdK	Cinase ciclina-dependente;
cDNA	DNA complementar;
CENP	Proteína centromérica;
CIK	Cinase inativadora das ciclinas;
c-Mad2	<i>Closed-Mad2</i> ;
CPNPC	Cancro pulmonar das não pequenas células;
CPPC	Cancro pulmonar das pequenas células;
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole;
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> ;
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i> ;
DNA	Ácido desoxirribonucleico;
dsRNA	<i>Double-stranded RNA</i> ;
EGF	Fator de crescimento endotelial;
EGFR	Recetor do fator de crescimento endotelial;
FBS	Soro fetal bovino;
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> ;
IM	Índice mitótico;
JAK	<i>Janus</i> cinase;
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogenes homolog</i> ;
Mad	Mitotic arrest deficiency;
MAPK	<i>Mitogen-activated Kinase</i> ;
MCC	Complexo do <i>checkpoint</i> mitótico;
miRNA	<i>Micro RNA</i> ;
mRNA	RNA mensageiro;
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio;
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato hidreto;

NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hidreto;</i>
NTC	<i>Non-template control;</i>
o-Mad2	<i>Open-Mad2;</i>
pAKT	<i>fosfoAKt;</i>
pb	Pares de bases;
PBS	<i>Phosphate buffered saline;</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase;
PI3K	<i>phosphoinositide-3-kinase;</i>
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real;
r.p.m	rotações por minuto;
RhoA	<i>Ras homolog gene family, A;</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex;</i>
RNA	Ácido ribonucleico;
RNAi	RNA de interferência;
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium;</i>
shRNA	<i>Short hairpin RNA;</i>
siRNAs	<i>Small interfering RNAs;</i>
STAT	Transdutor de sinal e ativador da transcrição;
TGF- α	Fator transformador do crescimento – <i>alfa</i> ;
TKI	Inibidores da tirosina cinase.

Capítulo I: Introdução

O cancro do pulmão é dos tipos de cancro com maior incidência e agressividade e, como tal, inúmeros esforços para uma melhor compreensão desta patologia têm sido realizados (Alberg and Samet 2003; Parente, Queiroga et al. 2007; Molina, Yang et al. 2008; Spiro, Tanner et al. 2010). Devido à toxicidade associada às opções terapêuticas tradicionais (radioterapia e quimioterapia), têm sido pesquisadas novas formas de tratamento. Uma das mais recentes estratégias consiste na aplicação da terapia molecular direccionada, que visa atingir alvos celulares específicos com poucos efeitos colaterais para o paciente (Molina, Yang et al. 2008; Stinchcombe and Socinski 2009). A grande vantagem desta terapêutica é o facto de que, teoricamente, devido à sua maior especificidade, preserva a viabilidade de um grande número de células saudáveis, diminuindo a intensidade e frequência dos efeitos colaterais. Tal pode ser justificado pelo facto da atuação desses medicamentos ser dirigida a alvos específicos presentes na célula tumoral e, muitas vezes, ausentes na célula saudável (Molina, Yang et al. 2008; Stinchcombe and Socinski 2009).

Vários componentes moleculares têm vindo a ser alvo de interesse terapêutico, tais como proteínas envolvidas em vias de transdução de sinal, proteínas relacionadas com o mecanismo de morte celular programada, antigénios de superfície celular, genes de supressão tumoral, etc. Uma outra classe de alvos terapêuticos que tem merecido bastante atenção é constituída por proteínas com funções específicas na mitose, nomeadamente, proteínas pertencentes ao mecanismo de controlo da mitose, o *checkpoint* mitótico (Molina, Yang et al. 2008; Stinchcombe and Socinski 2009).

Este capítulo visa contextualizar o trabalho apresentado na presente tese, iniciando-se com uma breve descrição acerca do cancro do pulmão e das novas formas terapêuticas para o seu tratamento. Posteriormente serão revistos conceitos essenciais para uma melhor compreensão do ciclo celular, enfatizando a etapa da mitose e a sua regulação, bem como a forma como esta pode ser explorada numa perspetiva terapêutica.

1.1 Cancro do Pulmão

1.1.1 Epidemiologia do cancro do pulmão

Anualmente, cerca de 1,3 a 1,5 milhões de pessoas são diagnosticadas com cancro do pulmão (Alberg and Samet 2003; Parente, Queiroga et al. 2007; Molina, Yang et al. 2008; Spiro, Tanner et al. 2010). A Sociedade Americana de Cancro (ACS) estima que em 2011, nos Estados Unidos da América, o cancro do pulmão corresponda a 14% de novos casos diagnosticados com cancro e a 27% das mortes, também por cancro (Society 2011). Em Portugal, o cancro do pulmão é o 4º cancro mais frequente, com uma incidência de 16,4% e uma taxa de mortalidade de 15,8% (Figura 1, Globocan 2008).

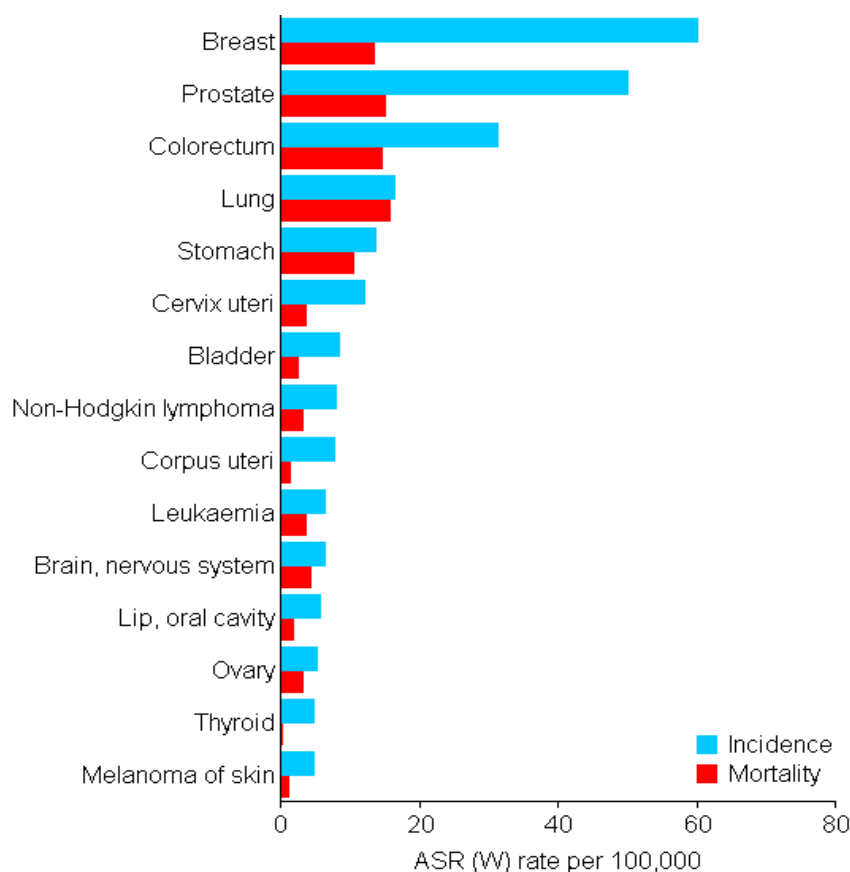


Figura 1: Tipos de cancro mais frequentes em Portugal, em ambos os sexos, no ano 2008
(Retirado de Globocan 2008).

De um modo geral, a incidência desta patologia tem vindo a diminuir no sexo masculino, tendo passado de 102 casos em 1984 para 71 casos em 2006. No sexo feminino, tem

vindo a aumentar, tendo atingido agora um *plateau* (Parente, Queiroga et al. 2007; Society 2011). A sobrevivência relativa da doença a 1 ano é de 42%, mas a 5 anos é de apenas 16%. Nos casos em que a patologia é diagnosticada numa fase ainda localizada (o que acontece em apenas 15% dos casos), a sobrevivência relativa a 5 anos aumenta para 53% (Society 2011).

1.1.2 Classificação histopatológica do cancro do pulmão

O cancro do pulmão pode ser subdividido em dois grandes grupos - cancro pulmonar das não pequenas células (CPNPC) e cancro pulmonar das pequenas células (CPPC), ambos distintos clínica, histológica, genética e bioquimicamente (Cowell 2001). O CPPC é o tipo histológico de cancro do pulmão mais agressivo, com uma sobrevivência média inferior a 4 meses. Este apresenta-se clinicamente com um fenótipo celular característico: células pequenas e altamente condensadas, pelo que o diagnóstico é quase exclusivamente baseado nos achados histológicos (Cowell 2001). Por sua vez, o CPNPC é aquele que constitui cerca de 80% de todos os casos de cancro do pulmão diagnosticados, e é um grupo constituído por diferentes tipos histológicos, subdividindo-se nas classes: adenocarcinoma do pulmão (inclui o subtipo bronquioalveolar), carcinoma das células escamosas, carcinoma das grandes células e carcinoma indiferenciado (Cowell 2001; Institute 2008). Apesar de cada tipo histológico apresentar diferentes diferenciações celulares, todos apresentam características clínicas e respostas aos tratamentos semelhantes (Cowell 2001; Institute 2008).

1.1.3 Novas opções terapêuticas para o cancro do pulmão

As opções de tratamento para o cancro do pulmão dependem do tipo histológico (CPPC ou CPNPC) e do estadio da doença, e podem incluir as seguintes terapias: recesso cirúrgica do tumor (lobectomia), radioterapia, quimioterapia e terapia molecular alvo-dirigida (Molina, Yang et al. 2008; Society 2011). Estas podem ser administradas de forma individual ou combinada. A aplicação destas terapias apresenta resultados aquém do desejável, uma vez que apenas 30 a 40% dos pacientes com cancro do pulmão cumprem os objetivos de resposta à terapêutica, sendo a sobrevivência média de apenas 1 ano para os doentes nos estadios mais avançados (estadios III e IV), e a sobrevivência a 5 anos para apenas 14% (Ray, Salgia et al. 2009; Mitsudomi 2010). Considerando tal realidade, muito se tem investido na investigação e desenvolvimento de novas classes de agentes terapêuticos que atuem em alvos específicos, obtendo-se desse modo poucos efeitos colaterais para o paciente. Esta estratégia é designada por terapia molecular alvo-dirigida. A terapia molecular alvo-dirigida para o tratamento de

CPNPC tem como principal objetivo terapêutico a inibição do EGFR (recetor do fator de crescimento endotelial) (sobrexpresso no CPNPC), no sentido de interferir com vias de sinalização envolvidas no crescimento celular, na angiogenese e apoptose (Hoag, Azizi et al. 2009; Reade and Ganti 2009). As formas terapêuticas de inibição do EGFR passam pela inibição do recetor por intermédio de anticorpos monoclonais anti-EGFR e por pequenas moléculas inibidoras da atividade intracelular tirosina cinase do recetor (Figura 2, Ray, Salgia et al. 2009; Reade and Ganti 2009; Stinchcombe and Socinski 2009).

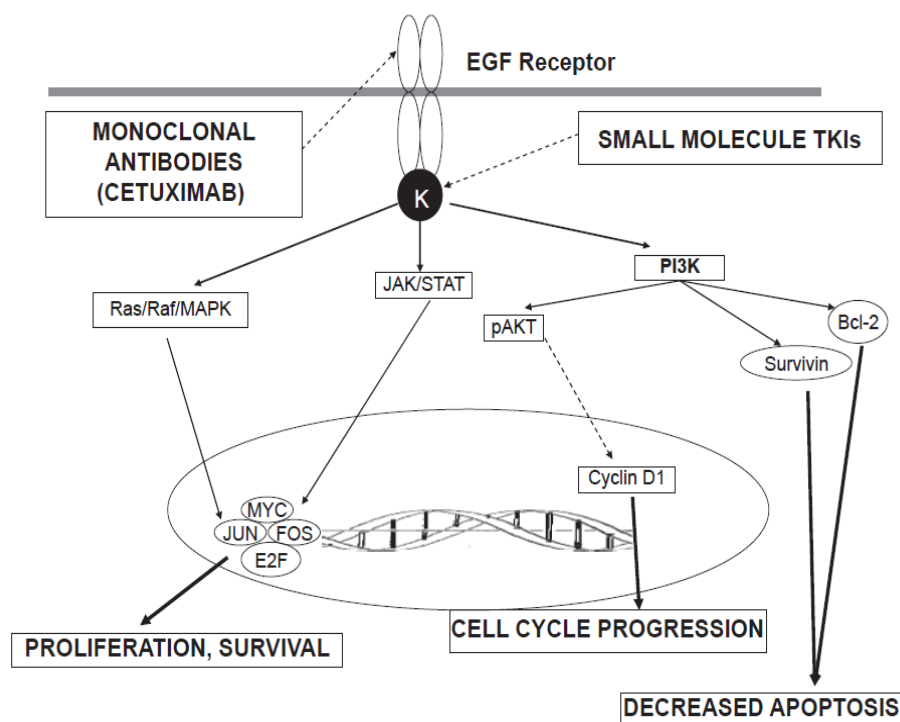


Figura 2: Via de sinalização do EGFR. A ligação de um dos ligandos ao EGFR ativa o domínio intracelular tirosina cinase (K), que ativa uma cascata de sinalização celular que culmina com o aumento da proliferação, progressão do ciclo celular e diminuição da apoptose. As setas sólidas indicam a estimulação dos recetores, ao passo que as setas tracejadas indicam a supressão. TKIs: inibidores da tirosina cinase; PI3K: *phosphoinositide-3-kinase*; STAT: transdutor de sinal e ativador da transcrição ; JAK: *Janus* cinase; pAKT: fosfoAkt; MAPK: *mitogen-activated* cinase; Bcl-2: *B-cell lymphoma 2 gene* (Retirado de Reade and Ganti 2009).

O *cetuximab* (Figura 2) é um anticorpo monoclonal que se liga ao domínio extracelular do EGFR com uma afinidade 5 vezes superior à dos ligandos naturais TGF- α (fator transformador de crescimento alfa) e EGF (fator de crescimento endotelial) (Reade and Ganti 2009). A ligação ao domínio extracelular previne a dimerização do recetor EGFR e, dessa forma, evita a subsequente ativação (por auto-fosforilação) do domínio

intracelular tirosina cinase do recetor. Os fármacos *gefitinib* e *erlotinib* (*small molecule TKIs*, Figura 2) são pequenas moléculas que se ligam competitivamente ao domínio intracelular tirosina cinase do EGFR. Em ambas as formas terapêuticas se interrompe a cascata de sinalização celular a jusante, pela inibição da ativação da cascata de sinalização celular (Ray, Salgia et al. 2009; Reade and Ganti 2009).

1.1.4 Silenciamento da expressão génica mediado por siRNAs

Desde a sua descoberta em 1998, o RNA (ácido ribonucleico) de interferência (RNAi) tem revolucionado a investigação clínica. Pequenos RNAs, incluindo *small interfering RNA* (siRNAs), *short hairpin RNA* (shRNA) e *microRNA* (miRNA), medeiam o mecanismo de silenciamento génico pós-transcricional, tornando-o numa potencial terapia molecular alvo-dirigida com elevada especificidade, adaptabilidade, eficácia e eficiência. O mecanismo de RNAi baseia-se no silenciamento da expressão de um gene específico através da clivagem das moléculas de RNA mensageiro (mRNA) codificadas por esse gene (Figura 3). Este processo inicia-se pela introdução celular de moléculas de mRNA de cadeia dupla (dsRNA) com a sequência desejada; de seguida a molécula de dsRNA é clivada pela enzima *Dicer*, pertencente à família das endonucleases RNase III. Tal processo origina vários fragmentos de siRNA com aproximadamente 21 nucleótidos, após o que ocorre a incorporação, separadamente, dos fragmentos de siRNA no complexo de indução do silenciamento de RNA (RISC), sendo a cadeia antissense utilizada na deteção de moléculas de mRNA complementares. Aquando a deteção de tais mRNAs, o complexo RISC será responsável pela sua clivagem, graças à sua atividade de endonuclease (Lieberman, Song et al. 2003; Meister and Tuschl 2004; Bumcrot, Manoharan et al. 2006; Ashfaq, Yousaf et al. 2011).

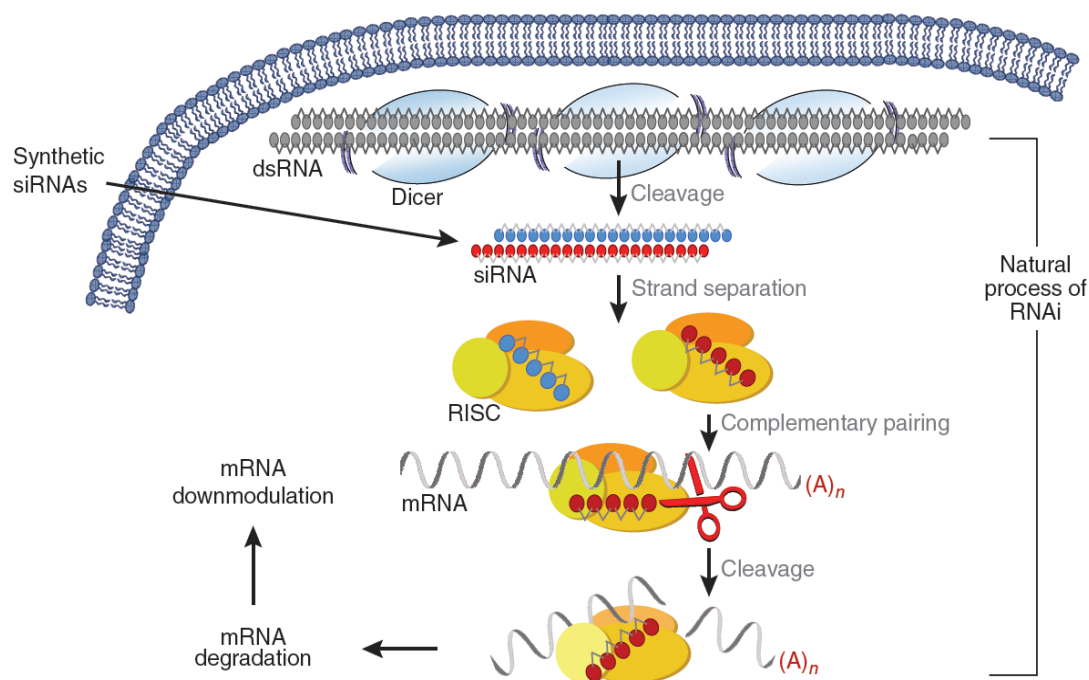


Figura 3: Mecanismo de silenciamento da expressão gênica mediada por siRNAs. A sequência siRNA é clivada, pela enzima Dicer, em sequências siRNA. Essas sequências siRNA são incorporadas, separadamente, pelo complexo RISC, que se liga à sequência de mRNA complementar às sequências siRNA. Essa sequência mRNA é depois clivada pela enzima *Argonaute*, que pertence ao complexo RISC (Retirado de Bumcrot, Manoharan et al. 2006).

Vários estudos têm demonstrado que a técnica de siRNA tem um elevado potencial terapêutico, e pode ser utilizada no tratamento de algumas doenças, como infecções víricas, cancro, doenças autoimunes e neurodegenerativas (Lieberman, Song et al. 2003; Oh and Park 2009). O emergente potencial terapêutico desta técnica deve-se à capacidade de possibilitar a depleção de uma vasta gama de proteínas alvo, uma vez que permite interferir com qualquer mRNA de interesse, independentemente da localização celular da proteína por ele codificada, contrariamente ao verificado nas terapias convencionais (Bumcrot, Manoharan et al. 2006; Oh and Park 2009). Outra vantagem inerente é o facto de os siRNAs interagirem apenas com a tradução do mRNA e não com a transcrição, pelo que essas sequências de siRNA não interferem com o DNA genómico, reduzindo assim possíveis efeitos adversos na alteração génica (Oh and Park 2009).

Vários estudos demonstraram ter sido bem-sucedidos na administração e eficácia de siRNA no tratamento do CPNPC (Figura 4), tendo como alvo genes que codificam para

proteínas essenciais para a patogenicidade deste tipo de cancro, como por exemplo: gene *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), que codifica para a proteína KRAS, uma proteína sinalizadora intracelular envolvida na promoção do crescimento celular (Choi, Ryu et al. 2010); proteína RhoA (*Ras homolog gene family A*), proteína envolvida no processo de metastização (Asnaghi, Vass et al. 2010); proteína inibidora da apoptose, survivina (Yang, Li et al. 2010); a proteína Akt, envolvida na regulação da sobrevivência, progressão e crescimento celular (Lee, Kim et al. 2008); supressão da expressão de recetores para o EGF (Zhang, Zhang et al. 2004).

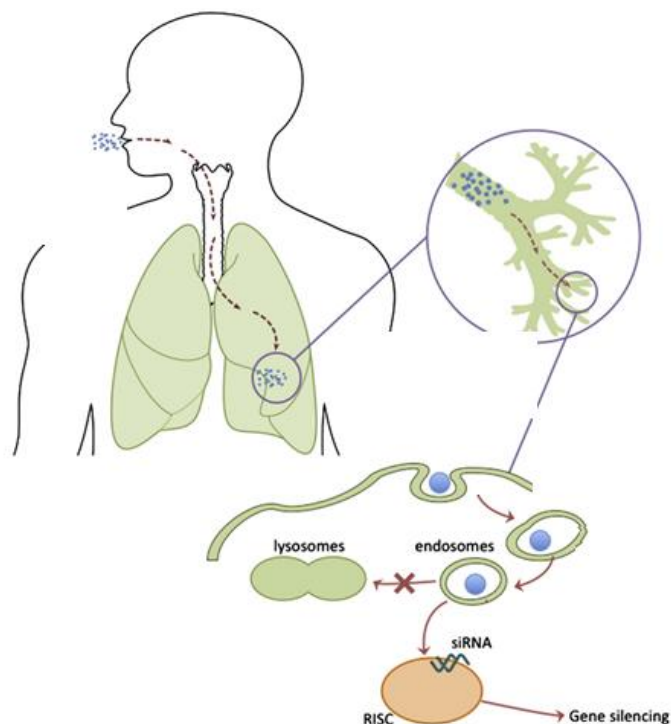


Figura 4: Esquema ilustrativo dos passos envolvidos na entrega de siRNA ao pulmão. Os siRNAs revestidos podem ser inalados, sob a forma de aerossóis, de modo a serem internalizados, por endocitose, pelas células alvo (no trato respiratório inferior). No interior da célula, o endossoma vai evitar a degradação do siRNA pelos lisossomos e permitir a ligação da molécula ao complexo RISC iniciando, desta forma, o processo de RNAi, que culmina com o silenciamento génico (Adaptado de Lam, Liang et al. 2011)

Não obstante, algumas desvantagens estão associadas a esta tecnologia, tais como efeitos inespecíficos, toxicidade devido à saturação do mecanismo de RNAi endógeno e duração limitada do silenciamento. Nos últimos tempos, vários estudos têm vindo a ser desenvolvidos para melhorar tais contrapartidas (Davis, Zuckerman et al. 2010; Cheng and Saltzman 2011; Gao, Liu et al. 2011; Lam, Liang et al. 2011).

1.2 Ciclo Celular

Durante o ciclo celular, a célula passa por uma série de alterações sequenciais que estão na base da perpetuação celular e, conseqüentemente, dos organismos. O ciclo celular de uma célula eucariota pode ser dividido em dois eventos fundamentais: a interfase e a mitose (Figura 5). A interfase, período mais longo do ciclo, está subdividida em 3 fases, a fase G₁, fase S e G₂. As fases G₁ e G₂ representam os intervalos (*Gaps*) no ciclo celular compreendidos entre a síntese de DNA (ácido desoxirribonucleico) (fase S) e a mitose (Malumbres and Barbacid 2001; Ferreira and Correia 2005). Durante a mitose, ocorre a divisão nuclear e, posteriormente, a divisão citoplasmática ou citocinese. É neste contexto que se realiza a segregação equitativa das cromátidas irmãs, dando origem a duas células filhas geneticamente idênticas à célula que lhes deu origem (Malumbres and Barbacid 2001; Morgan 2007). Em certas condições, dependendo dos sinais de crescimento e das condições do meio envolvente, certas células podem enveredar por um estado de quiescência designado por G₀ (Malumbres and Barbacid 2001; Morgan 2007).

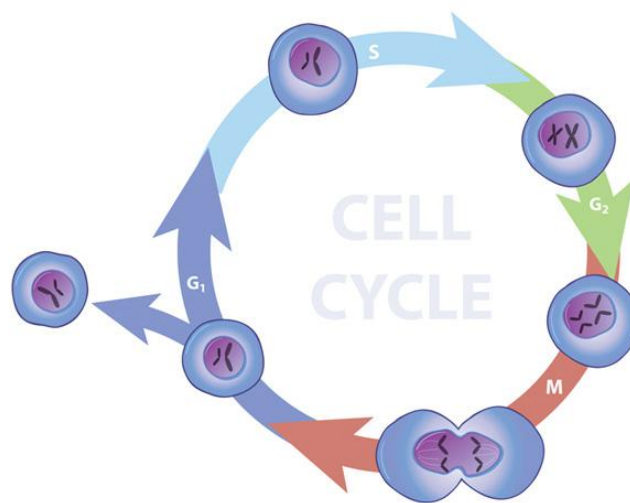


Figura 5: Esquema do ciclo celular em eucariotas. Representação esquemática do ciclo celular de uma célula eucariota, em que são representadas as fases de síntese de DNA (fase S), e da mitose (fase M), separadas por dois intervalos (G₁ e G₂) (Retirado de Morgan 2007).

1.2.1 Mitose

O termo mitose refere-se ao processo celular que origina duas células com a mesma composição genética (mesmo número e tipo de cromossomas) da célula mãe, mantendo assim inalterada a composição e teor de DNA característico da espécie. A mitose pode ser dividida em cinco fases: profase, prometáfase, metafase, anáfase e

telofase (Figura 6) (Schafer 1998; Cheeseman and Desai 2008). O aumento do volume nuclear e a compactação, progressiva e organizada, da cromatina são o reflexo do início da profase. Neste período, os cromossomas encontram-se dispersos no nucleoplasma, sendo constituídos por duas moléculas de DNA idênticas, unidas por uma região de constrição designada de centrómero. Esta estrutura é o local onde inúmeras proteínas específicas se agrupam formando uma outra estrutura proteica denominada de cinetocoro, local onde futuramente se ligarão os microtúbulos. A fase seguinte, a prometáfase, é a fase em que a célula inicia a desorganização celular e dissipação do invólucro nuclear, e os centrossomas, centros organizadores de microtúbulos nos mamíferos, se deslocam da região peri nuclear em direção aos polos opostos da célula e iniciam a formação do fuso mitótico. Durante a prometáfase, os cromossomas continuam o seu encurtamento e espessamento, tornando possível a distinção entre as cromátidas irmãs e os cinetocoros tornam-se visíveis de cada um dos lados do centrómero. A captura dos dois cinetocoros pelos microtúbulos e o alinhamento bipolar dos cromossomas numa zona equatorial resulta da atividade dinâmica exibida pelos microtúbulos. Uma vez completo este processo, designado de metafase, a célula reúne as condições requeridas de modo a transitar para a anáfase. Na anáfase, dá-se a separação das cromátidas irmãs, fruto da divisão longitudinal dos centrómeros. De seguida, cada cromátida ascende para um dos polos da célula, ao longo das fibras do fuso mitótico. Na telofase, há reorganização da membrana nuclear em torno de cada grupo de cromossomas que ascendeu a cada polo, reaparecem os nucléolos, a membrana celular, e os cromossomas descondensam e alongam-se. Subsequentemente, inicia-se a citocinese (divisão do citoplasma), que originará duas células com idêntica composição genética, perfeitamente individualizadas. Durante a citocinese, ocorre a clivagem do citoplasma, que culmina na separação das duas células filhas. Nas células animais, a citocinese é promovida pela constrição progressiva de um anel contrátil de actina e miosina (Lodish, Berk et al. 2000; Malumbres and Barbacid 2001; Vermeulen, Bockstaele et al. 2003; Ferreira and Correia 2005; Cheeseman and Desai 2008).

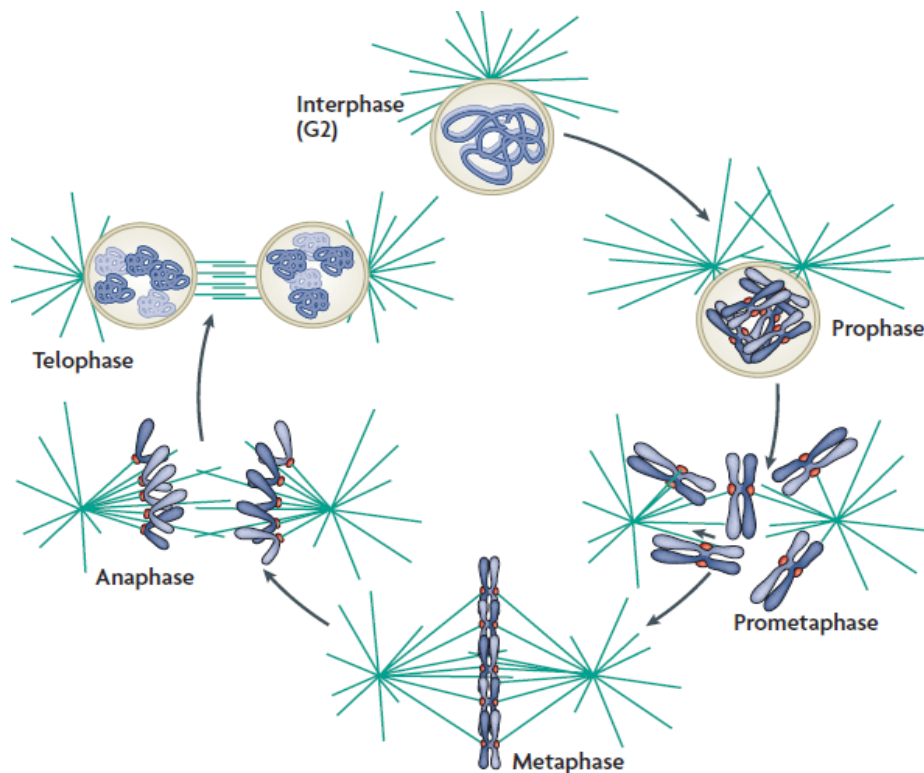


Figura 6: Representação esquemática das várias etapas mitóticas em células eucariotas. A reorganização dos microtúbulos e movimentos dos cromossomos encontram-se em destaque (Retirado de Cheeseman and Desai 2008).

1.2.2 Regulação do ciclo celular

Durante as diferentes fases do ciclo celular, são necessários mecanismos de regulação celular que assegurem a normal sequência dos eventos. Esses mecanismos são dependentes de uma série de proteínas reguladoras: cinases ciclina-dependentes (Cdk) e ciclinas. As Cdk são proteínas cinases de serina/treonina, ativadas parcialmente pela ligação a diferentes subunidades de ciclinas (Schafer 1998; Vermeulen, Bockstaele et al. 2003). Nas células animais, foram descritas nove Cdk, sendo as Cdk 1 (também designada por Cdc2 (*cell division cycle protein*), 2, 4 e 6 as mais ativas na regulação do ciclo celular (Vermeulen, Bockstaele et al. 2003). A ativação das Cdk ocorre por fosforilação pelas cinases ativadoras de ciclinas (CAK), do resíduo conservado de treonina (160), ao passo que a inativação ocorre pela fosforilação nos resíduos de tirosina (15) e tirosina (14) pelas cinases *wee* e *mlk1* (Schafer 1998; Vermeulen, Bockstaele et al. 2003). Para a sua ativação completa, as Cdk requerem a associação com ciclinas, uma família de proteínas expressas durante o ciclo celular, cujos níveis de expressão são regulados por dois processos: controlo transcrricional e proteólise

controlada, pelo sistema ubiquitina-proteossoma (Schafer 1998). A especificidade das Cdk's em diferentes momentos do ciclo celular está determinada pela subunidade de ciclina com a qual se liga, sendo que cada fase do ciclo é caracterizada por um único padrão de atividade Cdk-ciclina (Figura 7) (Murray 2004; Takahashi-Yanaga and Sasaguri 2008). As ciclinas são proteínas com múltiplas funções reguladoras cuja expressão é cíclica durante o ciclo celular, e podem dividir-se em duas classes: ciclinas G1/S, que inclui as ciclinas do tipo D e E, e ciclinas mitóticas (G2/M), que incluem as ciclinas do tipo A e B (Murray 2004; Takahashi-Yanaga and Sasaguri 2008).

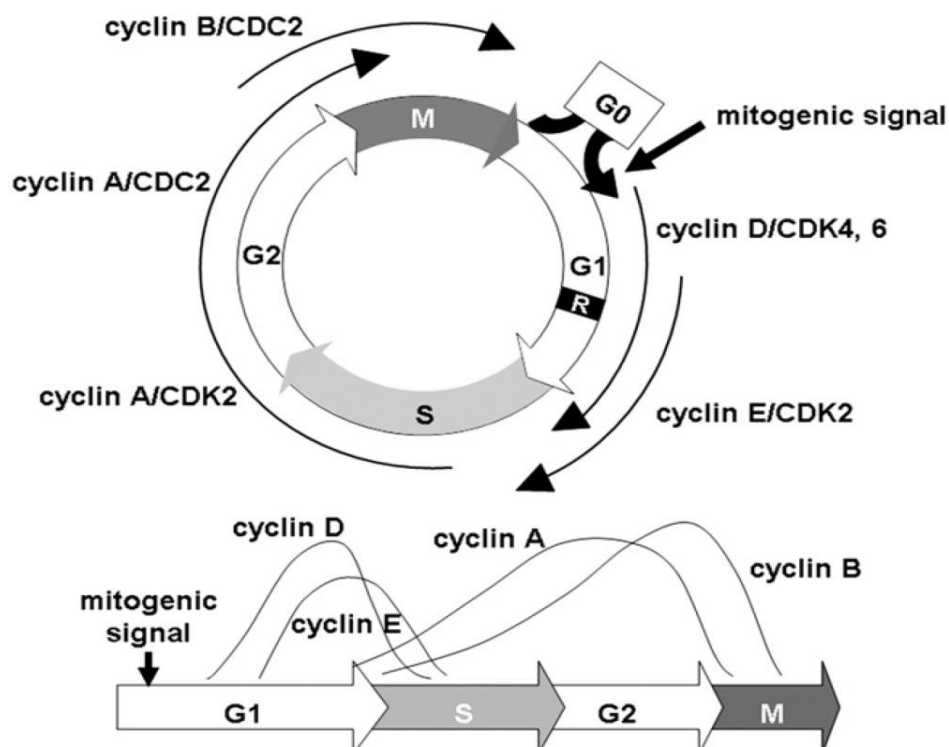


Figura 7: Representação esquemática da atividade dos complexos ciclinas-Cdks nas diferentes fases do ciclo celular. Cada fase do ciclo celular é caracterizada por um único padrão de atividade dos complexos Cdk-ciclina. O complexo ciclina D-Cdk4/6 controla a entrada no ciclo, o complexo ciclina E-Cdk2 inicia o processo de replicação do DNA, o complexo ciclina A-Cdk2 estimula a replicação do DNA, o complexo ciclina A-Cdk1 promove os eventos iniciais da mitose e, finalmente, o complexo ciclina B-Cdk1 (cdc2 na Figura) é fundamental para a entrada e desenvolvimento da mitose (Retirado de Takahashi-Yanaga and Sasaguri 2008).

Os diferentes estadios da mitose são caracterizados pelo rápido e coordenado desaparecimento das ciclinas A e B, determinante para garantir que as células voltam à interfase antes de iniciarem um novo ciclo de replicação do DNA. Esta destruição é coordenada pelo complexo promotor da anafase/ciclossoma (APC/C), que promove a degradação da ciclina B pelo proteossoma, conduzindo à inativação da Cdk1. A atividade do APC/C é modelada pela sua ligação à Cdc20 (Musacchio and Salmon 2007; Barbosa, Nascimento et al. 2011).

1.2.3 Controlo do ciclo celular

A análise molecular da divisão celular tem demonstrado que existe uma série de mecanismos de controlo celular (coletivamente chamados de *checkpoints*), que permitem controlar a progressão da célula nas diferentes fases do ciclo celular, permitindo que a célula apenas inicie a fase seguinte quando os eventos realizados na fase anterior estejam corretamente terminados (Malumbres and Barbacid 2001; Ferreira and Correia 2005). Desta forma, estes *checkpoints* são essenciais para a estabilidade genética por permitirem a prevenção da apoptose, de senescência e de transformação maligna (Malumbres and Barbacid 2001; Ferreira and Correia 2005). Existem quatro tipos de *checkpoints*: *checkpoint* de G1/S (antes da entrada na fase S), *checkpoint* de S (durante a fase S), *checkpoint* G2/M (antes da entrada na fase M) e *checkpoint* mitótico (durante a fase M). Entre as fases G1/S e G2/M encontram-se os principais pontos de controlo celular, que asseguram que o ciclo celular seja completado de uma forma fidedigna, sem erros, pela deteção de danos no DNA: nas células que contêm lesões no DNA, a Cdk1 permanece inativada por fosforilação da tirosina (15), bloqueando a entrada da célula em mitose. Por sua vez, no *checkpoint* de S verifica-se o bloqueio do ciclo na fase S após danos no DNA, de uma forma dependente do gene supressor tumoral p53, uma proteína supressora tumoral, protetora do genoma. Em resposta ao *stress*, os níveis da p53 aumentam e estimulam uma série de transcrições de diferentes genes, entre os quais o da p21, uma cinase inativadora das ciclinas (CIK), que resulta na inibição de Cdks (especialmente o complexo ciclina E-Cdk2), que conduz a uma paragem no ciclo celular, evitando a replicação do DNA lesado. Quando a lesão do DNA não é passível de correção, a proteína p53 induz a morte celular (Kaufmann and Paules 1996; Schafer 1998; Clarke and Gimenez-Abian 2000; McGowan 2003; Vermeulen, Van Bockstaele et al. 2003; Grzelakowska-Sztubert 2004). Por último, o *checkpoint* mitótico garante a fiabilidade na segregação dos cromátídeos, pelo prolongamento da metafase até que todos os cromossomas estejam corretamente ligados aos microtúbulos e bi-

orientados no fuso mitótico (Clarke and Giménez-Abián 2000; Martin-Lluesma, Stucke et al. 2002; Smith, Giménez-Abián et al. 2002).

1.2.4 *Checkpoint* mitótico

O *checkpoint* mitótico é parte integrante de um mecanismo de sobrevivência celular que monitoriza as ligações e interações entre os cinetocoros e os microtúbulos do fuso mitótico. Este *checkpoint* mantém-se ativo até à correta bi-orientação de todos os cromossomas no fuso, de forma a assegurar a correta segregação dos cromossomas na anafase, prevenindo uma iniciação prematura da segregação dos cromossomas e assegurando que cada célula filha receba uma cópia completa do genoma da célula mãe. Uma falha neste mecanismo de controlo pode resultar em aneuploidias das células filhas, e dessa forma pode contribuir para a tumorigénese (Martin-Lluesma, tucke et al. 2002; Musacchio and Salmon 2007; Suijkerbuijk and Kops 2008; Ciliberto and Shah 2009; Kang and Yu 2009).

Segundo Ciliberto & Shah (2009) (Ciliberto and Shah 2009), o modelo base do *checkpoint* mitótico resume-se à interação entre sinais inibitórios (que previnem a entrada da célula em anafase) e a atividade das moléculas promotoras da anafase. O principal componente envolvido no mecanismo de produção de sinais inibitórios é o cinetocoro (Figura 8), que é uma estrutura do cromossoma, associada ao centrómero, altamente especializada, e à qual se vão ligar os microtúbulos do fuso mitótico (Cheeseman and Desai 2008; Ciliberto and Shah 2009; Powers, Franck et al. 2009). Segundo Taylor, Scott et al. 2004, os cinetocoros irmãos que ainda não estão corretamente ligados aos microtúbulos geram um “sinal inibitório” que vai prevenir a entrada da célula em anafase, até que estejam corretamente ligados aos microtúbulos e alinhados na placa metafásica.

Nos últimos anos, têm sido realizados inúmeros estudos genéticos que têm revelado muitos dos componentes do *checkpoint* mitótico, como as proteínas Bub 1 (*budding uninhibited by benzimidazole*), Bub3, BubR1 (*Bub related protein 1*); Mad (*mitotic arrest deficiency*) 1, Mad2 (Martin-Lluesma, Stucke et al. 2002; Suijkerbuijk and Kops 2008; Ciliberto and Shah 2009; Kang and Yu 2009). Todas estas proteínas se localizam no cinetocoro, principalmente durante os estadios iniciais da mitose (Martin-Lluesma, Stucke et al. 2002).

Aquando da entrada da célula em mitose, no cinetocoro são emitidos “sinais inibitórios” continuamente até que se estabeleçam todas as ligações microtúbulos – cinetocoro, em todos os cromossomas. Esses “sinais inibitórios” consistem na formação do *mitotic*

checkpoint complex (MCC), constituído pelas proteínas BubR1, Bub3, Mad2 e Cdc20. Este complexo previne a ativação do APC por sequestração do seu ativador Cdc20 (Figura 8, D'Angiolella, Mari et al. 2003; Bharadwaj and Yu 2004; Taylor, Scott et al. 2004; Musacchio and Salmon 2007; Suijkerbuijk and Kops 2008; Ciliberto and Shah 2009; Silva, Barbosa et al. 2011). O mecanismo de inibição do APC ainda não está bem elucidado, mas sabe-se que envolve a interferência com a função da Cdc20 (que é a proteína ativadora do APC) (Hwang, Lau et al. 1998; Martin-Lluesma, Stucke et al. 2002; D'Angiolella, Mari et al. 2003; Suijkerbuijk and Kops 2008; Ciliberto and Shah 2009; Kang and Yu 2009).

Quando todos os cromátídeos estão corretamente ligados, o *checkpoint mitótico* é inativado, ocorrendo a dissociação do MCC (Musacchio and Salmon 2007; Kang and Yu 2009). Tal vai permitir que a Cdc20 se ligue ao APC/C, ativando-o. O complexo APC/C-Cdc20 vai degradar as proteínas Securina e Ciclina B (Kang and Yu 2009). A degradação da Securina dá-se pela reação de poli-ubiquinização (promovida pelo APC/C), e vai ativar, conseqüentemente, a Separase, que vai, por sua vez, clivar as moléculas de Coesina que unem os cromátídeos irmãos (Taylor, Scott et al. 2004). A degradação da Ciclina B vai, por seu turno, inativar a Cdk1, e dessa forma promover a saída da mitose. Nesse momento, a célula pode iniciar a anáfase (D'Angiolella, Mari et al. 2003; Bharadwaj and Yu 2004; Musacchio and Salmon 2007; Suijkerbuijk and Kops 2008; Ciliberto and Shah 2009; Kang and Yu 2009).

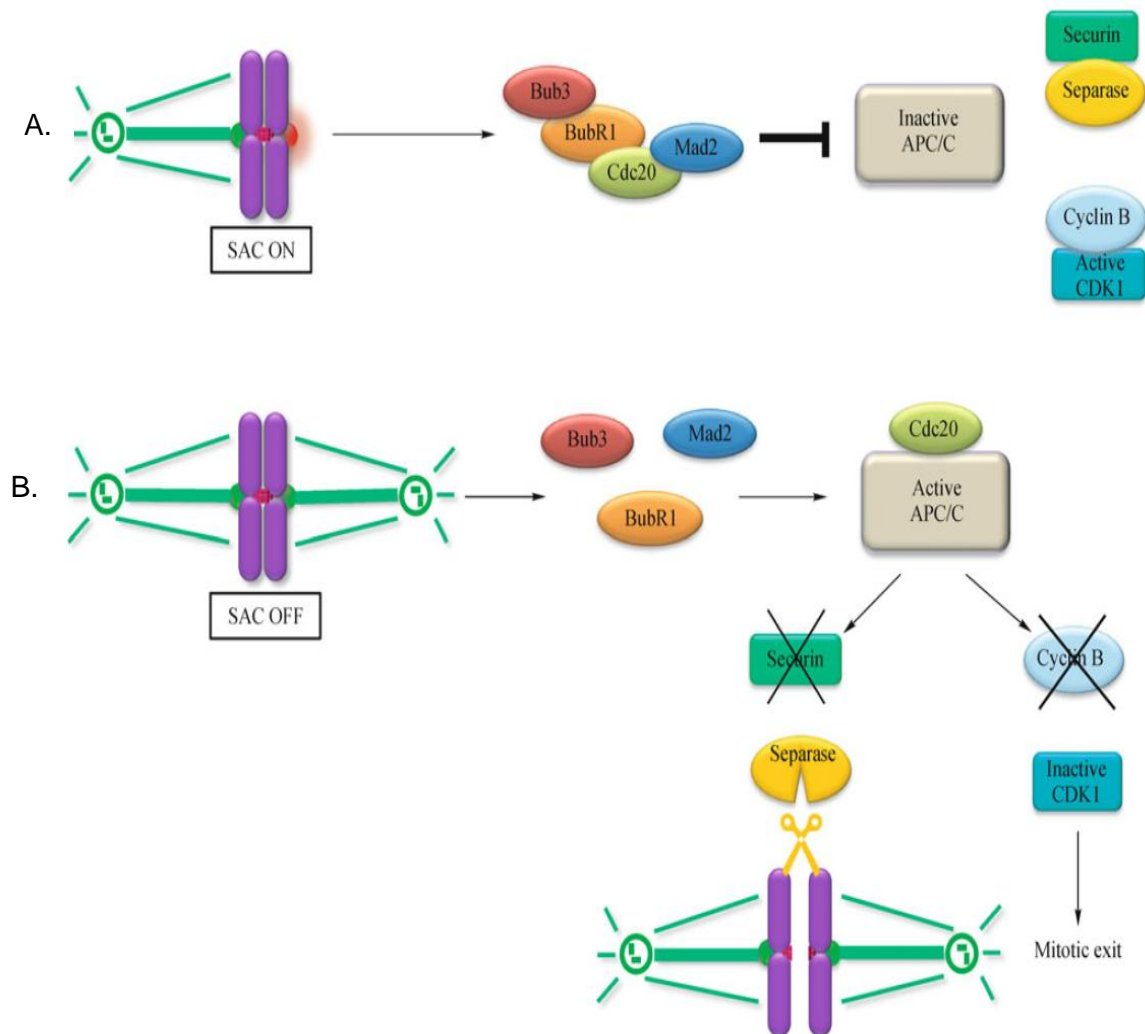


Figura 8: Mecanismo molecular da sinalização do *checkpoint* mitótico. A) O *checkpoint* mitótico é ativado na presença de cinetocoros livres (círculo vermelho). Os cinetocoros livres recrutam as proteínas do *checkpoint* para gerar o complexo MCC, que difunde um sinal inibidor constituído pelas proteínas Mad2, BubR1 e Bub3. Pela ligação à Cdc20, o MCC mantém o APC/C inativo, evitando a degradação da Securina e Ciclina B, resultando na paragem do ciclo celular. B) Quando os cinetocoros estão corretamente alinhados, o MCC desagrega-se e a Cdc20 é libertada, ativando o APC/C, e, consequentemente, ocorre a degradação da Securina e da Ciclina B. A degradação da Securina provoca a ativação da Separase que cliva as coesinas entre as cromátidas irmãs, levando à sua separação. A degradação da Ciclina B diminui a atividade da Cdk1, resultando na saída da mitose (Retirado de Barbosa, Nascimento et al. 2011).

1.2.5 Mad2

A proteína Mad2 pertence à família das Mad's, e pode ter duas conformações: closed-Mad2 (c-Mad2) e open-Mad2 (o-Mad2). Estas são a conformação imóvel e móvel da Mad2, respetivamente. As funções da Mad2 no *checkpoint mitótico* resumem-se, segundo o modelo *Mad2 template*, à função da proteína no mecanismo de formação do complexo c-Mad2-Cdc20, que ativa o *checkpoint mitótico* (Musacchio and Salmon 2007; Silva, Barbosa et al. 2011). De um modo geral, segundo o modelo *Mad2 template*, a c-Mad2 liga-se constitutivamente à Mad1, e o complexo formado (c-Mad2-Mad1) serve como recetor, nos cinetocoros livres, para a o-Mad2, transformando-a em c-Mad2 ligada à Cdc20. O complexo c-Mad2-Cdc20 deixa o cinetocoro e atua como um equivalente estrutural da Mad2-Mad1, desencadeando um mecanismo de *feedback* positivo que vai promover a Auto amplificação do complexo c-Mad2-Cdc20 que converte mais o-Mad2 em c-Mad2/Cdc20 no citosol, levando a uma amplificação do sinal (Figura 9, Musacchio and Salmon 2007; Silva, Barbosa et al. 2011).

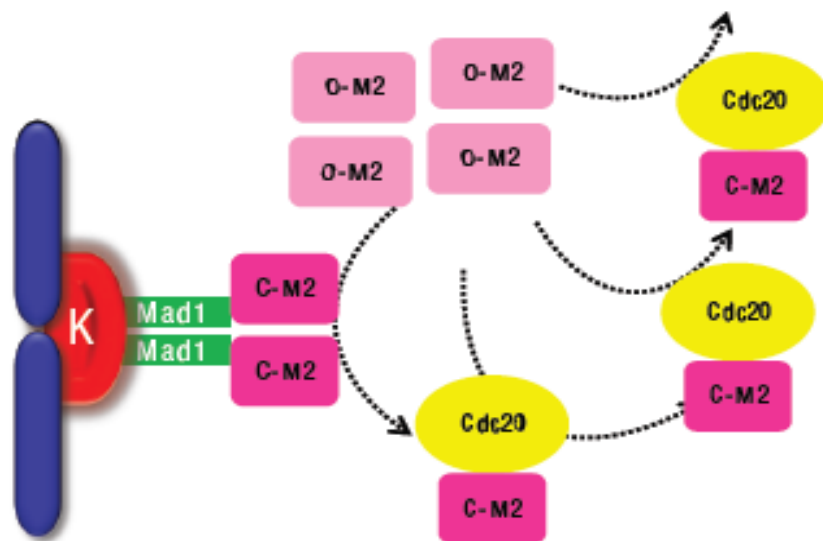


Figura 9: Modelo Mad2 *template*. A conformação C-Mad2 associada à Mad1 serve como recetor cinetocoreano à conformação O-Mad2. A C-Mad2 sofre alterações conformacionais que a permitem ligar-se à Cdc20. Este complexo O-Mad2-Cdc20 atua como um equivalente estrutural do complexo Mad1- Mad2, e vai desencadear um mecanismo de *feedback* positivo, que vai promover a auto amplificação do complexo c-Mad2-Cdc20 (Retirado de Silva, Barbosa et al. 2011).

A Cdc20 tem epítomos de ligação à Mad2 semelhantes aos da Mad1, pelo que ambas induzem as mesmas alterações conformacionais de dimerização da Mad2 que, deste modo, pode ocorrer por duas formas diferentes: pela formação dos complexos Mad1-c-Mad2-o-Mad2 e c-Mad2-Cdc20-o-Mad2 (Musacchio and Salmon 2007).

As interações, no citosol, entre o-Mad2 e o complexo Mad1-c-Mad2, assim como o mecanismo de *feedback* positivo do complexo Mad2-Cdc20, são controladas pela proteína p31^{comet} (Musacchio and Salmon 2007). Segundo Musacchio and Salmon (2007), a p31^{comet} é uma proteína que compete com a o-Mad2 pela ligação à c-Mad2. Testes *in vitro* mostraram que a proteína compete com alta afinidade e previne, dessa forma, a formação do complexo de dimerização da Mad2 (c-Mad2-o-Mad2). A capacidade de ligação da p31^{comet} se ligar à c-Mad2 é regulada negativamente pelo cinetocoro (Musacchio and Salmon 2007).

1.2.6 BubR1

A BubR1 é uma cinase mitótica específica que exerce, essencialmente, duas funções durante o *checkpoint* mitótico: regulação da atividade do complexo APC/C-Cdc20 e monitorização da atividade da CENP-E (proteína centromérica E) (Chan, Jablonski et al. 1999; Fang 2002; Bharadwaj and Yu 2004; Musacchio and Salmon 2007; Logarinho and Bousbaa 2008). A BubR1 é uma proteína homóloga da Mad3 (em *S. cerevisiae*). Ambas, BubR1 e Mad3, têm a mesma função no *checkpoint mitótico*, diferindo apenas na atividade catalítica da BubR1 (que não parece necessária na Mad3) pois a BubR1 possui um domínio cinase que a Mad3 não possui (Bharadwaj and Yu 2004). Estudos, *in vivo* e *in vitro*, têm demonstrado que a BubR1 está envolvida na regulação da atividade do complexo APC/C-Cdc20 pela sua ligação à Cdc20, impedindo-a de se ligar ao APC/C (Fang 2002; Bharadwaj and Yu 2004). Resultados de análises quantitativas, realizadas por Fang (2002), indicam que essa ligação à Cdc20 é mais eficaz que a ligação Mad2-Cdc20, que a BubR1 é um inibidor da Cdc20 12 vezes mais potente que a Mad2 e que a BubR1 forma, *in vivo*, um MCC com a Bub3, Cdc20 e Mad2 3000 vezes mais eficiente que a Mad2. No mesmo estudo, os autores determinaram também que, apesar de altas concentrações de BubR1 e Mad2 serem suficientes para inibir a Cdc20, as proteínas BubR1 e Mad2 promovem-se mutuamente para a ligação à Cdc20 e funcionam sinergicamente em concentrações que quantitativamente inibem o complexo APC/C-Cdc20 (Fang 2002).

Estudos recentes têm demonstrado que a atividade cinase da BubR1 parece estar relacionada com outras funções durante o ciclo celular, nomeadamente na sinalização

do cinetocoro (associada à monitorização das ligações cinetocoro-microtúbulo) e no alinhamento dos cromossomas (Chan, Jablonski et al. 1999; Bharadwaj and Yu 2004; Musacchio and Salmon 2007; Logarinho and Bousbaa 2008). Estas funções estão associadas à proteína motora do cinetocoro, CENP-E, que é uma cinesina associada ao cinetocoro, implicada na correta ligação cinetocoro – microtúbulo e no correto alinhamento dos cromossomas no fuso mitótico (Fang 2002; Musacchio and Salmon 2007). Segundo Musacchio & Salmon (2007), a CENP-E liga-se, *in vitro*, à BubR1 e ativa a sua atividade cinase, sendo essa atividade reprimida quando a CENP-E se liga ao microtúbulo (Musacchio and Salmon 2007) .

1.3 Nanopartículas

O desenvolvimento de vetores para o transporte dos siRNA é um pré-requisito para a melhoria no sucesso da terapia molecular, devido à instabilidade e inespecificidade celular do RNA. Assim sendo, a ligação dos oligonucleótidos de siRNA a vetores catiónicos tem sido estudada, entre os quais nanopartículas de quitosano (Schiffelers, Ansari et al. 2004; Howard, Rahbek et al. 2006; Nagpal, Singh et al. 2010; Wang, Zeng et al. 2011)

O vetor ideal para transporte de siRNA deve ter as seguintes características particulares: deve ser biocompatível, biodegradável e não imunogénico; deve assegurar a entrega suficiente nas células alvo, com a sequência de siRNA devidamente protegida das nucleases plasmáticas; deve evitar a rápida depuração renal e hepática; deve promover, no interior da célula alvo, a fácil libertação do siRNA no citoplasma, de forma a permitir a correta interação do siRNA com o complexo RISC (Oh and Park 2009; Mao, Sun et al. 2010). Atualmente, os principais vetores utilizados são víricos ou não-víricos. Apesar de os víricos serem mais eficientes que os não-víricos, apresentam as desvantagens de serem tóxicos, imunogénicos e de poderem conduzir à transformação maligna das células, pela possibilidade de incorporação do DNA vírico no material genético da célula, pelo que, nos últimos anos, os investigadores têm estudado com maior interesse os vetores não-víricos (Mao, Sun et al. 2010; Wang, Zeng et al. 2011). Os vetores não víricos têm adquirido maior atenção devido às vantagens de facilidade na síntese e baixa imunogenicidade. Estes vetores incluem lipossomas, nanopartículas e polímeros terapêuticos catiónicos. Nos últimos anos, um dos vetores catiónicos estudado para o transporte de siRNA tem sido o quitosano (Schiffelers, Ansari et al. 2004; Howard, Rahbek et al. 2006; Mao, Sun et al. 2010; Nagpal, Singh et al. 2010; Wang, Zeng et al. 2011).

O quitosano (Figura 10) é um mucopolissacarídeo obtido por desacetilação da quitina, e é um polímero com características vantajosas para o transporte de material genético (plasmídeos de DNA, oligonucleótidos e siRNAs) (Mao, Sun et al. 2010). As nanopartículas de quitosano têm merecido vários estudos como vetores no transporte de fármacos e proteínas terapêuticas, incluindo siRNA, devido a algumas características importantes, como: capacidade muco-adesiva e de penetração na mucosa; capacidade de promover a permeabilidade em barreiras biológicas *in vivo*; biodegradabilidade e biocompatibilidade; estabilidade; baixa toxicidade (Howard, Rahbek et al. 2006; Mao, Sun et al. 2010; Nagpal, Singh et al. 2010; Wang, Zeng et al. 2011). Estas características promovem um aumento da eficácia e uma diminuição da toxicidade associadas aos fármacos transportados (Howard, Rahbek et al. 2006; Wang, Zeng et al. 2011).

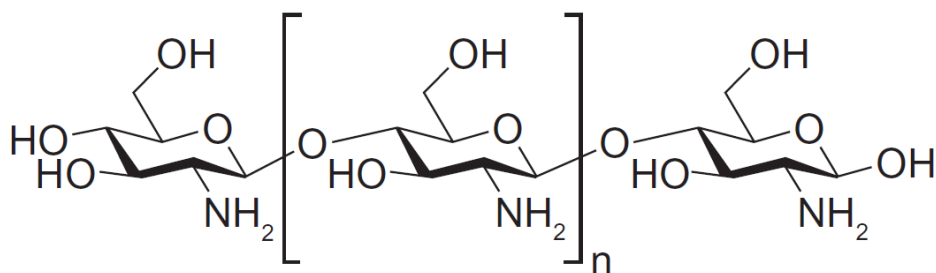


Figura 10: Estrutura do quitosano (Retirado de Wang, Zeng et al. 2011).

O potencial do quitosano como vetor de siRNA deve-se, em parte, à sua propriedade catiónica: a carga positiva forma facilmente complexos estáveis com moléculas carregadas negativamente, como é o caso dos ácidos nucleicos (Mao, Sun et al. 2010). No entanto, a eficiência da transfeção génica com nanopartículas de quitosano depende significativamente das propriedades físicas e químicas deste: peso molecular e grau de desacetilação do quitosano; *rácio* N:P das nanopartículas; do pH do meio e do método de preparação das nanopartículas (Mao, Sun et al. 2010; Wang, Zeng et al. 2011). Vários autores testaram diferentes formulações com diferentes pesos moleculares e graus de desacetilação e concluíram que a eficiência máxima de transfeção ocorre quando o *rácio* de grau de desacetilação/peso molecular é elevado (Mao, Sun et al. 2010; Wang, Zeng et al. 2011). Alguns estudos sugerem também que o quitosano tem efeitos anti tumorais, *in vivo* e *in vitro*, devido às suas capacidades de interferir diretamente com o metabolismo celular (Tavaria, Fernandes et al. 2011); inibir o crescimento celular; induzir a apoptose, pelo que as nanopartículas de quitosano têm

merecido vários estudos como vetores no transporte de moléculas (Howard, Rahbek et al. 2006; Nagpal, Singh et al. 2010; Wang, Zeng et al. 2011).

1.4 Objetivos

O cancro do pulmão é considerado a doença oncológica mais mortal e mais frequentemente diagnosticada em todo o mundo. Devido à toxicidade associada aos tratamentos desta doença, têm sido investigadas novas estratégias terapêuticas, entre as quais tem sido avaliada a aplicação de oligonucleótidos de siRNA, cujo alvo é o *checkpoint* mitótico, e cuja interferência pode conduzir a saídas prematuras da mitose e, eventualmente, à morte celular.

Face ao exposto, neste trabalho pretende-se interferir com a expressão dos genes que codificam para as proteínas Mad2 e BubR1 em linhas tumorais de CPNPC (linhas celulares A549 e H460) usando sequências de siRNA encapsuladas em nanopartículas de quitosano, de forma a verificar se o silenciamento dos genes Mad2 e BubR1 interfere com a sobrevivência e proliferação dessas linhas tumorais. Assim, neste trabalho propusemo-nos, numa primeira fase, verificar se o silenciamento dos genes Mad2 e BubR1 interfere com a sobrevivência e proliferação de linhas tumorais de CPNPC (linhas A549 e H460) usando sequências de siRNA. Posteriormente, numa segunda fase, propusemo-nos administrar esses mesmos siRNA encapsulados em nanopartículas de quitosano, e verificar se o silenciamento dos genes Mad2 e BubR1 interfere com a sobrevivência e proliferação dessas linhas tumorais.

Capítulo II: Metodología Experimental

2.1 Cultura Celular

2.1.1 Linhas celulares e cultura celular

Neste trabalho foram utilizadas três linhas celulares: HeLa (células de adenocarcinoma do colo do útero), H460 (células de CPNPC, do subtipo histológico das grandes células) e A549 (células de CPNPC, do subtipo histológico adenocarcinoma). As linhas celulares H460 e A549 foram utilizadas como células de teste, por pertencerem a diferentes subtipos histológicos de CPNPC e por expressarem o recetor EGFR em diferentes níveis: as células H460 expressam baixos níveis de EGFR, enquanto as células A549 expressam níveis elevados do recetor à superfície celular.

2.1.2 Condições de cultura celular

Todas as manipulações que envolveram as culturas celulares foram efetuadas em câmara de fluxo laminar vertical, nível de biossegurança 2 (*Telstar Bio-II-A/P*), e em condições de assepsia. Todas as linhas celulares foram crescidas em frascos de plástico de poliestireno de 25 cm² de área de crescimento. As células HeLa e A549 foram mantidas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) e as células H460 em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*), suplementados com 10% e 5%, respetivamente, de soro fetal Bovino (FBS), 1% de L-glutamina e 1% de uma mistura de antibióticos: 100U/ml de penicilina-G, 100mg/ml de estreptomicina. As células foram mantidas em atmosfera húmida, à temperatura continua de 37°C, e a uma pressão de 5% de CO₂ numa estufa (*Heraeus Hera Cell Incubator*).

2.1.2.1 Subcultura celular

As linhas celulares utilizadas neste trabalho crescem em monocamada e aderentes à base dos frascos de cultura, pelo que é necessária a sua subcultura periódica, de forma a evitar a confluência e permitir, dessa forma, a manutenção do crescimento celular em fase exponencial.

O procedimento de subcultura celular iniciou-se com a aspiração do meio de cultura dos frascos de cultura e as células foram lavadas com uma solução isosmótica de PBS (*Phosphate buffered saline*) estéril (147mM NaCl; 27mM KCl; 1mM CaCl₂; 0,5mM KH₂PO₄ e 3,2 mM Na₂HPO₄ e 5,5mM glucose; pH 7,4). Após a lavagem, as células foram destacadas com tripsina-EDTA (0,25%) a 37°C, confirmando-se por microscopia de contraste de fase, o seu cesso do destacamento. Ao fim de 3 a 5 minutos foi adicionado

um volume de meio de cultura à suspensão celular (de forma a parar a ação da tripsina), seguido de homogeneização e contagem celular, numa câmara de *Neubauer* (no hemacitómetro), para determinação da densidade celular da suspensão celular (de acordo com a fórmula de cálculo abaixo). Por último, as células foram plaqueadas para novos frascos de cultura de 25cm² com uma densidade total de 0,08x10⁶ células (HeLa), 0,15x10⁶ (H460) e 0,15x10⁶ (A549). A cada 3-4 dias, atingido cerca de 80% de confluência do frasco de cultura, procedeu-se a nova passagem celular.

$$\text{Densidade celular (mL}^{-1}\text{)} = \frac{n}{N} \times \text{FD} \times 10^4$$

n: número de células contadas

N: número de quadrantes

FD: fator de diluição.

2.1.2.2 Congelamento e descongelamento de linhas celulares

Congelamento: as culturas celulares, em fase de crescimento exponencial, foram destacadas e a suspensão celular foi centrifugada a 1000r.p.m. (rotações por minuto) durante 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* (células) gentilmente em meio de congelamento (meio de cultura contendo 10% de DMSO (*Dimethyl sulfoxide*)). Depois de transferida para um criotubo, a suspensão foi incubada à temperatura ambiente durante 15 minutos, colocada a -80°C durante 24-48h, e finalmente, armazenada em azoto líquido.

Descongelamento: o criotubo contendo a suspensão celular congelada foi aquecido, rapidamente, em banho-maria a 37°C, com agitação leve. O seu conteúdo foi gentilmente pipetado e transferido para um frasco de 75cm² contendo meio de cultura previamente aquecido. Após incubação durante a noite, o meio foi renovado.

2.2 Tratamento de lamelas com poli-L-lisina

Colocaram-se entre 50 e 100 lamelas num recipiente contendo HCl 1M, seguindo-se uma incubação a 37°C por 4-16h. Após arrefecimento do recipiente à temperatura ambiente, removeu-se o HCl lavando-se cerca de dez vezes com ddH₂O. Após a lavagem, as lamelas foram mergulhadas em etanol absoluto (96%) e secas com um tecido suave. As lamelas foram depois distribuídas por caixas de *Petri*, nas quais se verteu a solução de poli-L-lisina e lavadas, cerca de 15 vezes, com ddH₂O. De seguida, foram mergulhadas em etanol 70% e, finalmente secas com um tecido suave, individualmente.

2.3 Determinação do índice mitótico

As células foram crescidas em poços individuais na densidade celular que assegurou o crescimento exponencial ($0,06 \times 10^6$ células). Após 24h, adicionou-se nocodazole ao meio de cultura, numa concentração final de $2 \mu\text{M}$. Nas células controlo não foi adicionado nocodazole. As culturas de cada uma das linhas celulares (HeLa, H460 e A549) foram observadas 16h após a adição do nocodazole, em microscópio de fase invertido (Nikon TE 2000-U), e foi quantificado o número total de células (mitóticas e interfásicas). O índice mitótico (IM) foi determinado como sendo a percentagem de células mitóticas relativamente ao número de células total. A experiência foi repetida três vezes, de forma independente.

2.4 Imunofluorescência

As células, crescidas sobre lamelas previamente tratadas com poli-*L*-lisina, foram fixadas em 2% p-formaldeído (Sigma) em PBS (137mM NaCl; 2,7mM KCl; 6,4mM KH_2PO_4 e 1 mM Na_2HPO_4 ; pH 7,2) e depois permeabilizadas com 0,2% Triton X-100 em PBS durante 7 minutos. De seguida, e em micro-atmosfera húmida, foram bloqueadas com 10% FBS em PBS. Após o bloqueio de antigénios não específicos, as lamelas foram incubadas com o anticorpo primário diluído em meio de bloqueio durante 1h à temperatura ambiente. De seguida, foram lavadas (3 vezes) em PBST (PBS contendo 0,05% Tween; pH 7,2) por 5 minutos. Depois incubou-se com o anticorpo secundário durante 1h à temperatura ambiente. Por último, após 3 lavagens com PBS por 5 minutos, montou-se em DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Sigma).

Os anticorpos primários usados foram: *mouse* anti-BubR1 monoclonal (1:600; Chemicon); *mouse* anti-Mad2 monoclonal (1:200; Sigma). Os anticorpos secundários usados foram: *anti-mouse* 568nm (1:1500; Molecular Probes); *anti rabbit* 568nm (1:1500; Molecular Probes). Os anticorpos usados foram diluídos em meio de bloqueio.

2.5 RNA de interferência e transfeção de células

As depleções de BubR1 e Mad2 foram efetuadas pela técnica RNAi com oligonucleótidos siRNA Mad2 (*human*) (Santa Cruz Biotechnology sc-35837) e siRNA BubR1 (*human*) (Santa Cruz Biotechnology sc-37542), nas linhas celulares HeLa, H460 e A549. Estes siRNAs eram constituídos, cada um, por um *pool* de 3 alvos específicos com 20-25 pb (pares de bases). As células a transfetar (HeLa, H460 e A549) foram plaqueadas em

placas de 6 poços (numa densidade celular de $0,035 \times 10^6$ células) em meio de cultura simples (DMEM e RPMI sem antibióticos e antimicóticos) contendo 5% de FBS. Cada poço da placa continha 1 lamela tratada com poli-L-lisina. Seguindo as instruções do fabricante, preparou-se uma mistura de meio Opti-MEM I (GIBCO) com Oligofectamina (Invitrogen) para o número de poços a transfectar, tendo em conta que, por poço, a quantidade a adicionar é de 15 µl e de 3 µl, respetivamente. Deixou-se atuar, durante 5 minutos, à temperatura ambiente, promovendo a formação de micelas lipídicas que possibilitam a internalização dos siRNAs nas células. Preparam-se tubos correspondentes aos siMad2 e siBubR1 e, em cada um, colocou-se a quantidade necessária de Opti-MEM I (184,4 µl por poço a transfectar), de siRNA (0,38 µg/µl de siMad2/poço e 0,30 µg/µl de siBubR1/poço) e da mistura preparada anteriormente (Opti-MEM I e Oligofectamina) e deixou-se incubar durante 30 minutos. Adicionou-se, então, o *cocktail* de transfecção aos respetivos poços e passadas 24 horas substituiu-se o meio de transfecção por meio completo. Os resultados da transfecção foram avaliados mais tarde. O Opti-MEM I, o meio de transfecção e os meios de cultura completos foram aquecidos a 37°C antes da sua utilização e os siRNAs foram mantidos no gelo ao longo do procedimento. Após a transfecção (48h, 72h, 96h e 120h) o RNA total foi extraído como descrito abaixo.

2.6 Extração de RNA total e sua quantificação

De forma a evitar possíveis contaminações durante a extração de RNA total, todo o material utilizado era “*RNAse free*”, assim como todas as superfícies de trabalho e material laboratorial utilizados foram prévia e periodicamente pulverizados com etanol 70% durante a extração. Após aspiração do meio de cultura, adicionou-se 0,5mL de reagente PUREZol (BioRad) a cada poço onde se encontrava a monocamada aderente das respetivas linhas celulares (as células foram crescidas em placas de 6 poços). Incubou-se durante 5 minutos à temperatura ambiente, de forma a permitir o destacamento das células, a lise celular, a inibição da atividade das RNAse e a dissociação dos compostos proteicos nucleares. Após a recolha dos lisados, adicionou-se 0,1mL de clorofórmio, e agitou-se vigorosamente durante 15 segundos. A solução foi incubada, com agitação constante, durante 5 minutos à temperatura ambiente, e posteriormente foi centrifugada a 12000g durante 15 minutos, a 4°C. Na centrifugação, o homogeneizado foi separado em três fases distintas (fase aquosa, interfase e fase orgânica) e procedeu-se à recolha da fase aquosa para um novo tubo. De seguida, adicionou-se, à fase aquosa recolhida, 0,250mL de isopropanol, misturou-se

delicadamente, incubou-se durante 5 minutos à temperatura ambiente, e procedeu-se a uma nova centrifugação a 12000g durante 10 minutos, a 4°C. Recolheu-se o sobrenadante, lavou-se o sedimento de RNA obtido com 0,5mL de etanol a 70%, e procedeu-se a uma nova centrifugação a 7500g durante 5 minutos, a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e secou-se o sedimento de RNA durante 10-15 minutos a 37°C. Posteriormente, o sedimento foi ressuspensão em 20µL de H₂O “*RNAse free*”. Os extratos de RNA total obtidos foram posteriormente armazenados a -80°C.

A concentração de RNA foi determinada (no equipamento “*NanoDrop 2000*”) por medição espectrofotométrica da densidade ótica a um comprimento de onda de 260nm, usando H₂O “*RNAse free*” como branco. A qualidade do RNA extraído foi analisada com base na razão da A_{260}/A_{280} .

2.7 *Real-time Polymerase Chain Reaction*

2.7.1 *Design dos primers*

Os *primers* utilizados estão descritos na tabela 1, e foram sintetizados pela empresa STABvida (Oeiras, Portugal). A especificidade e temperaturas de emparelhamento já haviam sido testadas no laboratório, tendo sido também verificada a inexistência de amplificação de DNA genómico.

Tabela 1: Sequências oligonucleotídicas dos *primers* utilizados em qRT-PCR para a amplificação dos genes de GAPDH, Mad2 e BubR1.

Gene	Primer	Sequência de oligonucleótidos	Posição de emparelhamento	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
GAPDH	Forward	5'-ACAGTCAGCCGCATCTTC-3'	49	101
	Reverse	5'GCCCCAATACGACCAAATCC-3'	149	
Mad2	Forward	5'-GTGGAACAACCTGAAAGATTGGT-3'	205	117
	Reverse	5'-GTCACACTCAATATCAAACCTGC-3'	321	
BubR1	Forward	5'-CAGATGCGATATTTTCAGGAAGGG-3'	512	82
	Reverse	5'-GCTTGAATTGTCGGTGCTG-3'	593	

2.7.2 Síntese de cDNA das linhas celulares em estudo

Procedeu-se à síntese de DNA complementar (cDNA) a partir do RNA total obtido de cada uma das linhas (HeLa, A549 e H460). Utilizou-se o *kit "iScript cDNA Synthesis Kit"* (BioRad). Cada reação de síntese continha 4µL de 5x "*iScript Reaction Mix*", 1 µL de "*iScript Reverse Transcriptase*", o volume de RNA total correspondente a 1µg e H₂O "*RNase free*" para um volume de reação final de 20µL. O programa de PCR (reação em cadeia da polimerase) selecionado foi: 5 minutos a 25°C; 30 minutos a 42°C e 5 minutos a 85°C. O cDNA obtido foi ulteriormente guardado a -80°C.

2.7.3 PCR quantitativo em tempo real

As reações de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) foram realizadas no aparelho iQ Thermal Cycler (BioRad), e utilizou-se o *kit "iQ™SYBER®Green Supermix"* (BioRad). As misturas de reação foram preparadas para um volume final de 25µl, e as experiências foram realizadas em triplicado para o gene de referência (controlo endógeno) (GAPDH - Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) e para cada um dos genes de interesse (Mad2 e BubR1). Como controlo negativo de amplificação para cada *primer* (NTC – *non-template control*), foi utilizada uma amostra com água. A análise da expressão génica foi realizada através da metodologia do cálculo $\Delta(\Delta c_T)$. Os níveis de

expressão dos genes do *checkpoint* foram normalizados com os níveis de GAPDH calculando o ΔC_T através do *software* do aparelho. Para avaliar a especificidade da reação (avaliar a existência de produtos de PCR não específicos) foi obtida uma curva de *melting* (curva de fusão), que indica o ponto correspondente à temperatura de dissociação dos *primers* específicos para as sequências alvo.

2.8 Ensaio de MTT

As células HeLa, H460 e A549 foram plaqueadas em placas de 96 poços (com uma densidade de $0,105 \times 10^6$ células), em meio de cultura simples (DMEM e RPMI sem antibióticos e antimicóticos) contendo 5% de FBS, e incubadas à temperatura de 37°C com 5% CO₂. Após 24 horas, as células foram transfectadas. Após 48h, 72h, 96h e 120h da transfeção procedeu-se à adição do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (5mg/ml em PBS), e as células foram incubadas durante 4 horas a 37°C. Após esse tempo, o meio de cultura foi removido e adicionou-se, a cada poço, 200µl de DMSO, e as placas foram agitadas durante 10 minutos. Aspirou-se 100µl da suspensão anterior para uma nova placa, e procedeu-se à leitura das absorvâncias a 550nm (leitor de microplacas BioTek synergy 2, com recurso ao *software* Gen5 (BioTek)).

2.9 Aquisição e tratamento de imagens

As imagens de fluorescência foram adquiridas num microscópio confocal *Spinning Disc AxioObserver Z.1 SD* (Carl Zeiss, Germany) acoplado a uma câmara *AxioCam MR3*, desconvolucionadas com recurso ao *software AxioVision 4.8.2*, projetadas utilizando o *software ImageJ versão 1.44* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) e processadas no programa *PhotoShop CS5* (Adobe Microsystems, CA). As imagens foram adquiridas utilizando a objetiva apocromática 63x. Para cada imagem, foram apresentados planos representativos, adquiridos com *Z-stacks*, com espaçamento de 0,4 µm, que demonstram o máximo da intensidade de projeção.

Capítulo III: Resultados e Discussão

Com o objetivo de interferir com expressão das proteínas Mad2 e BubR1 em células tumorais de CPNPC, procedeu-se à depleção destas proteínas usando siRNAs para cada uma, pelo uso de oligonucleótidos siMad2 e siBubR1. Foram utilizadas as linhas celulares HeLa, H460 e A549. As células HeLa foram utilizadas como controlo, por possuírem um *checkpoint* mitótico eficaz, constituindo por isso um bom modelo de células para estudos de *checkpoint*. As linhas celulares H460 e A549 foram utilizadas como células modelo do CPNPC no presente trabalho.

3.1 Validação dos oligonucleótidos siMad2 e siBubR1 na linha celular HeLa

Antes de proceder à depleção das proteínas Mad2 e BubR1 por RNAi, procedeu-se à validação dos siRNAs a utilizar. Assim, em células HeLa, a eficiência do silenciamento foi comprovada ao nível da proteína por imunofluorescência, e ao nível do mRNA que codifica para as proteínas Mad2 e BubR1, por qRT-PCR. As células HeLa foram utilizadas para esta etapa por possuírem um checkpoint mitótico eficiente. Assim, para além da validação da depleção de Mad2 ou de BubR1 por imunofluorescência e por qRT-PCR, o uso desta linha irá permitir a validação dos oligonucleótidos ao nível do fenótipo de inibição do checkpoint mitótico. Assim sendo, as células HeLa foram transfetadas com siRNAs dirigidos contra os mRNAs correspondentes às proteínas Mad2 e BubR1, e após 96h da transfeção foi realizada a técnica de imunofluorescência. Para esta técnica, recorreu-se à utilização de anticorpos monoclonais específicos para as proteínas Mad2 e BubR1, marcados com fluorocromos que permitem a deteção e localização das mesmas.

Na Figura 11, encontram-se os resultados obtidos no silenciamento da expressão dos genes que codificam para as proteínas Mad2 e BubR1 usando os siRNAs: Mad2 e siBubR1 nas células HeLa. As imagens foram obtidas ao fim de 72h de incubação. Nas situações controlo é possível verificar que ambas as proteínas (Mad2 e BubR1) se localizam nos cinetocoros durante a prometáfase. Nas células transfetadas não existe marcação para as proteínas Mad2 e BubR1, refletindo a sua depleção. Podemos também verificar que nas células controlo, os núcleos em interfase apresentam tamanho e forma regulares, enquanto nas células transfetadas estes exibem formas irregulares e disformes, o que corrobora a ocorrência de saídas prematuras e aberrantes da mitose, consequência da inibição do checkpoint mitótico devido à ausência das proteínas Mad2 e BubR1. Estes resultados estão de acordo com os resultados descritos na literatura (Orr, Bousbaa et al. 2007; Logarinho and Bousbaa 2008).

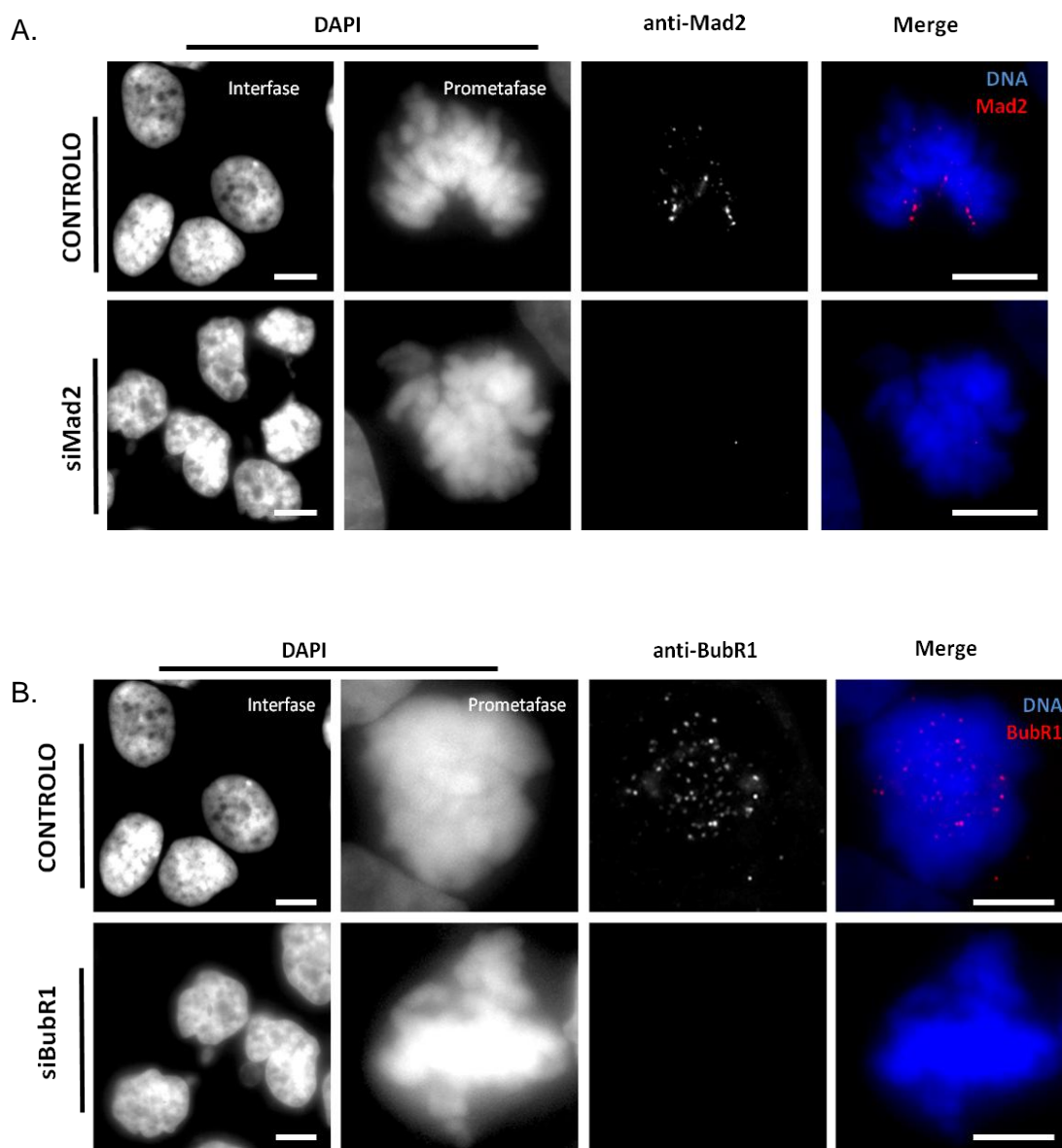


Figura 11: Fenótipo celular resultante da depleção das proteínas Mad2 e BubR1 por RNAi, em células HeLa. Imagens de imunofluorescência de células HeLa em interfase e prometáfase A) células HeLa controlo e transfetadas com siMad2, marcadas com anticorpos anti-Mad2 (vermelho). O DNA foi marcado com DAPI (azul). B) Células HeLa controlo e transfetadas com siBubR1, marcadas com anticorpos anti-BubR1 (vermelho). O DNA foi marcado com DAPI (azul). Barra= 5µm.

Posteriormente, para comprovar este silenciamento ao nível do mRNA, recorreu-se à técnica quantitativa qRT-PCR, a partir de RNA total extraído de culturas de células HeLa transfetadas durante 48h, 72h e 96h. Como controlo endógeno (*loading control*) utilizou-

se o gene constitutivo (gene de referência) que codifica a proteína GAPDH, que permitiu a anulação de pequenas diferenças inerentes à quantidade de amostra utilizada. Como controlo negativo, foi utilizada uma amostra com água (NTC). As experiências foram realizadas em triplicado para o gene de referência e para cada um dos genes de interesse (Mad2 e BubR1). Os níveis de expressão obtidos foram normalizados com os valores obtidos nas situações controlo, tendo esses valores sido estabelecidos como 1 (100%).

Na Figura 12 estão representados os resultados obtidos no qRT-PCR. Após 48h da transfeção com siMad2 ocorre silenciamento quase total da proteína, verificando-se níveis de expressão de mRNA que codifica para a proteína de $2 \pm 0,3\%$. Estes valores mantêm-se estáveis nos tempos de transfeção seguintes ($2 \pm 0,2\%$ e $3 \pm 0,4\%$ após 72h e 96h, respetivamente). Por sua vez, com siBubR1 verificou-se uma redução menos drástica dos níveis de mRNA ao fim de 48h ($32 \pm 5,2\%$). Nos tempos seguintes, o silenciamento foi mais expressivo, tendo-se verificado níveis $15 \pm 4,9\%$ (após 72h) e $14 \pm 2,0\%$ (após 96h). Estes resultados permitem constatar que após transfeção com os siRNAs (siMad2 e siBubR1), os níveis de expressão dos genes que codificam para as respetivas proteínas diminuem ao longo do tempo, comparativamente com as células controlo, garantindo dessa forma a eficácia da transfeção; o silenciamento relativo à proteína Mad2 é mais expressivo que o silenciamento da proteína BubR1, verificando-se níveis de silenciamento quase total às 48h.

Assim, os resultados obtidos por imunofluorescência corroboram os resultados obtidos por qRT-PCR e permitem concluir que os oligonucleótidos siMad2 e siBubR1 utilizados são eficientes na depleção das proteínas Mad2 e BubR1, respetivamente.

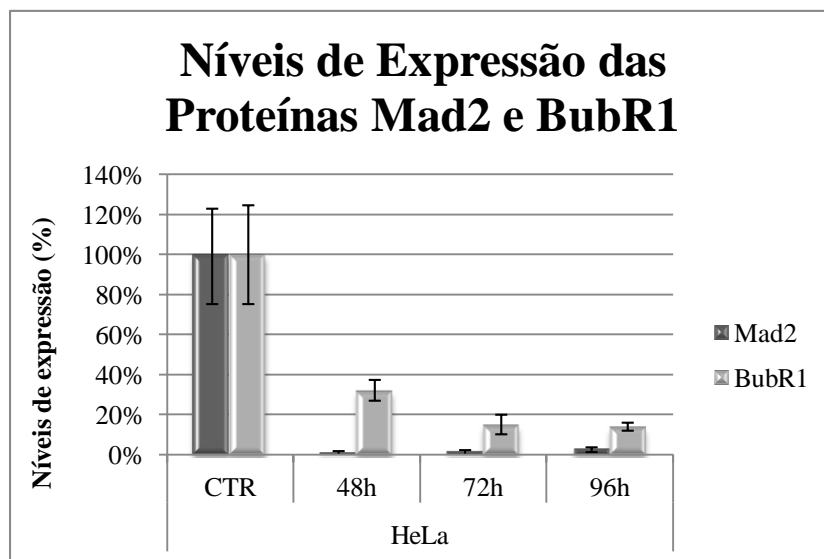


Figura 12: Eficiência da depleção das proteínas Mad2 e BubR1 em células HeLa, por RNAi. Níveis de expressão relativa dos mRNAs de Mad2 e BubR1 obtidos por qRT-PCR, nas culturas controle e após RNAi (48h, 72h e 96h). Os valores obtidos foram normalizados com os valores obtidos nas situações controle, tendo esses valores sido estabelecidos como 1 (100%).

3.2 Interferência na expressão dos genes Mad2 e BubR1 em células de CPNPC.

3.2.1 Eficiência da depleção das proteínas Mad2 e BubR1 em células de CPNPC

Nas Figuras 13 e 14, estão representadas as imagens de imunofluorescência obtidas 96h após a transfeção. Nas células controle de ambas as linhas (Figuras 13 A e 14 A) observou-se a localização normal das proteínas Mad2 e BubR1 nos cinetocoros: localizam-se nos cinetocoros das células em prometáfase, não sendo detetáveis nos mesmos em metáfase. Por sua vez, e conforme o esperado, nas células tratadas com os siRNAs (Figura 13 B e 14 B) verificando-se uma ausência de marcação para ambas as proteínas, Mad2 e BubR1, o que significa a eficácia do silenciamento na expressão das proteínas.

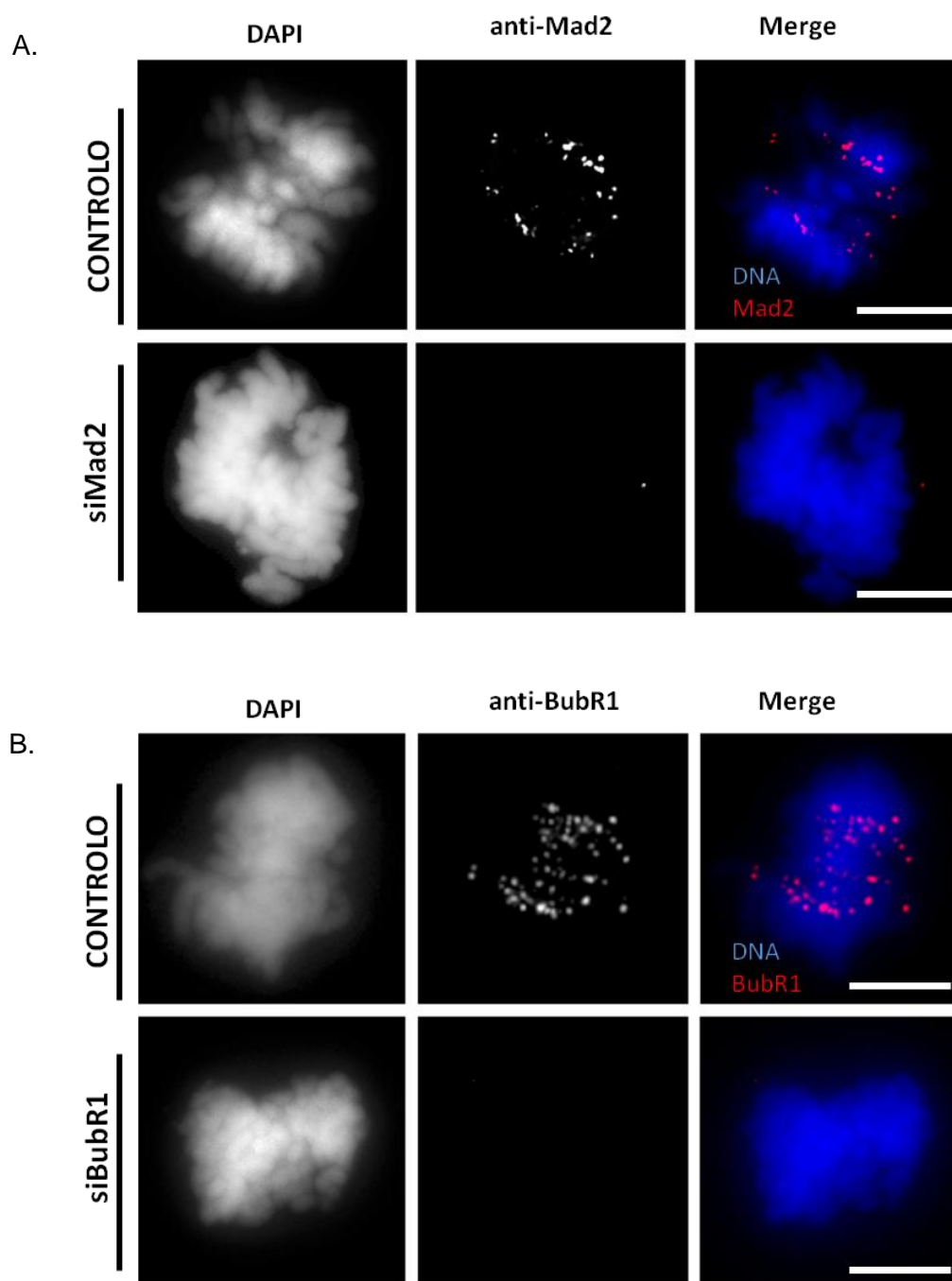


Figura 13: Depleção das proteínas Mad2 e BubR1 por RNAi, em células A549. Imagens de imunofluorescência de células A549 em prometáfase A) células A549 controlo e transfetadas com siMad2, marcadas com anticorpos anti-Mad2 (vermelho). O DNA foi marcado com DAPI (azul). B) Células A549 controlo e transfetadas com siBubR1, marcadas com anticorpos anti-BubR1 (vermelho). O DNA foi marcado com DAPI (azul). Barra = 5µm.

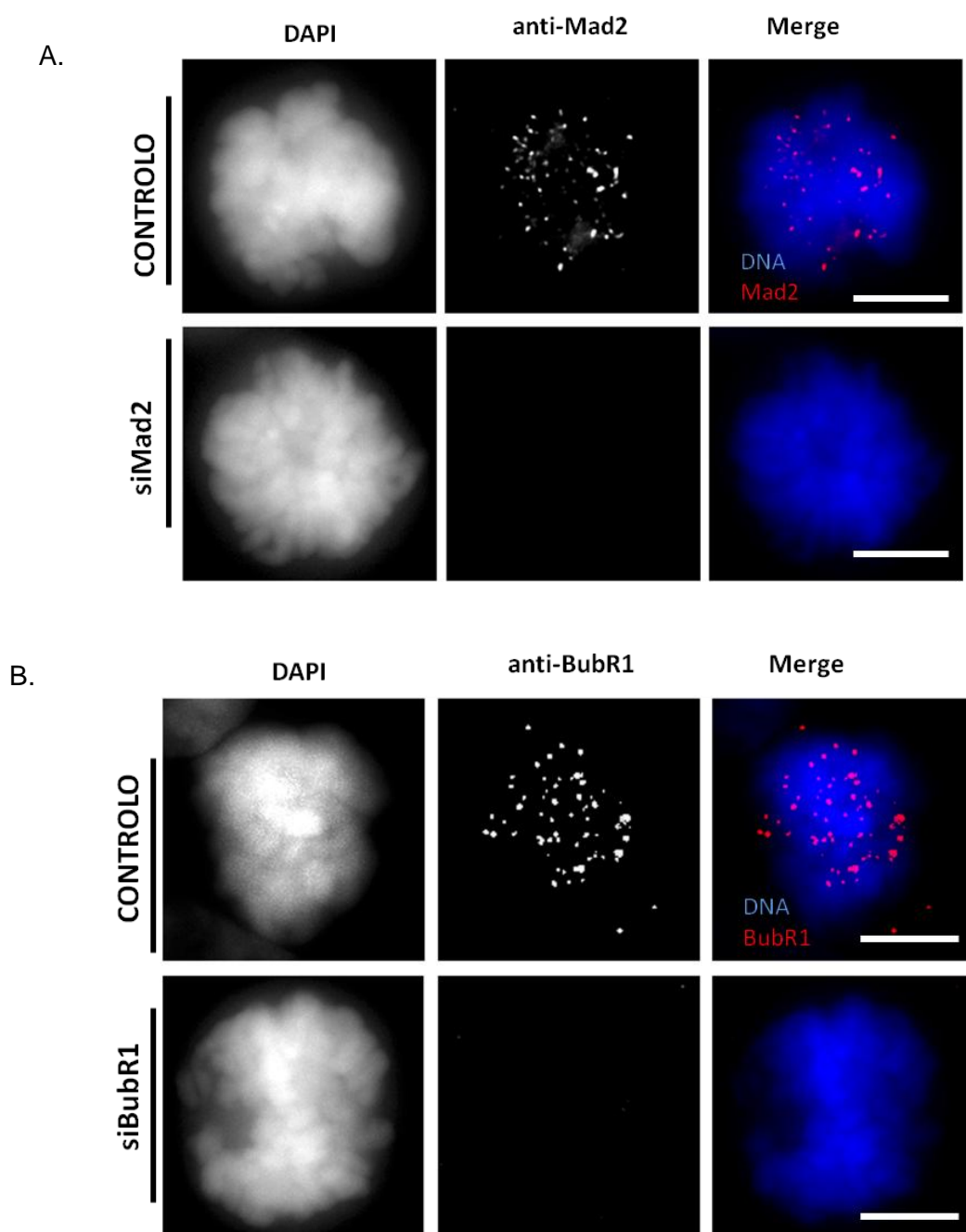


Figura 14: Depleção das proteínas Mad2 e BubR1 por RNAi, em células H460. Imagens de imunofluorescência de células H460 em prometáfase. A) células H460 controlo e transfetadas com siMad2, marcadas com anticorpos anti-Mad2 (vermelho). O DNA foi marcado com DAPI (azul). B) células H460 controlo e transfetadas com siBubR1, marcadas com anticorpos anti-BubR1 (vermelho). O DNA foi marcado com DAPI (azul). Barra = 5µm.

À semelhança do efetuado em células HeLa, a eficiência do silenciamento das proteínas Mad2 e BubR1 em células de CPNPC foi validada pela técnica de qRT-PCR, pela quantificação relativa dos mRNAs dessas proteínas nas linhas celulares. Como controlo endógeno, foi utilizado o gene GAPDH. Como controlo negativo, foi utilizada uma amostra com água (NTC). As experiências foram realizadas em triplicado para o gene de referência e para cada um dos genes de interesse (Mad2 e BubR1). Os níveis de expressão obtidos foram normalizados relativamente aos valores obtidos nas situações controlo, tendo esses valores sido estabelecidos como 1 (100%).

As Figuras 15 e 16 representam os níveis de expressão obtidos ao longo do tempo, após transfeção com siRNAs (siMad2 e siBubR1). Na Figura 15, verificamos que os níveis de expressão de mRNA de Mad2 diminuem significativamente após transfeção com siMad2 em ambas as linhas celulares (linha A549: CTR=100%±8,0, 48h=11%±0,5, 72h=6%±0,4, 96h=6%±0,2 e 120h=2%±0,2; linha H460: CTR=100%±5,3, 48h=15%±2,5, 72h=11%±1,3, 96h=7%±0,8 e 120h=20%±1,3). Por sua vez, de igual forma, na Figura 16 pode observar-se que os níveis de mRNA de BubR1 também diminuem ao longo do tempo, mas em menor grau comparativamente aos verificados após depleção da Mad2 (linha A549: CTR=100%±4,7, 48h=73%±8,8, 72h=6%±3,1, 96h=16%±0,8 e 120h=30%±0,1; linha H460: CTR=100%±9,3, 48h=52%±5,5, 72h=44%±5,3, 96h=25%±1,9 e 120h=43%±2,5).

Assim, os resultados obtidos permitem-nos concluir que ambos os oligonucleótidos siRNA utilizados são eficientes na depleção das proteínas Mad2 e BubR1 nas linhas CPNPC. No entanto, com o siMad2 conseguimos um silenciamento mais eficiente da proteína Mad2, pelo que a proteína Mad2 seria o alvo selecionado para depleção em experiências futuras, em detrimento da proteína BubR1.

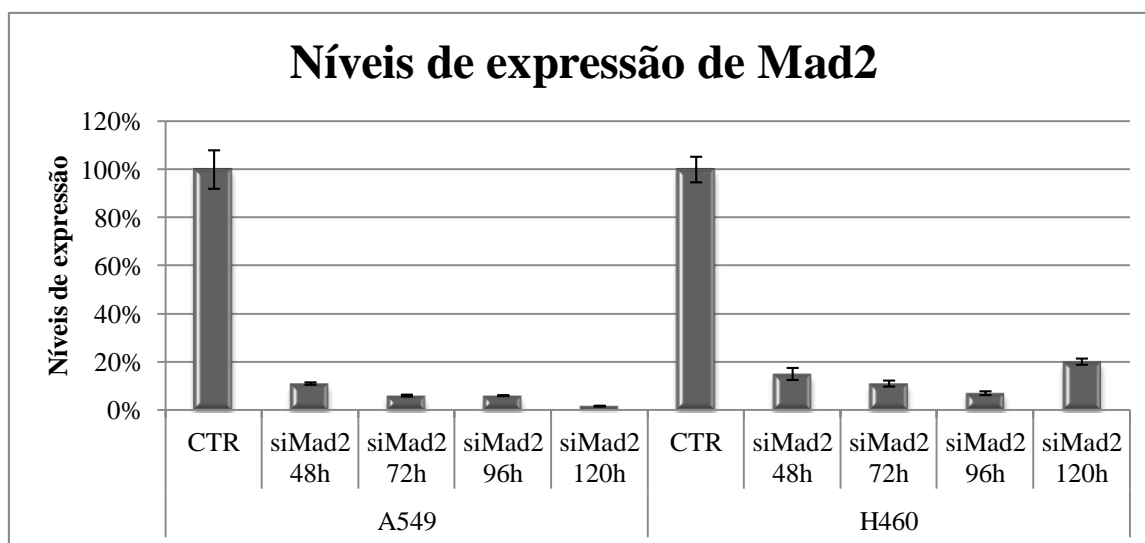


Figura 15: Eficiência da depleção da proteína Mad2 em células de CPNPC (A549 e H460), por RNAi. Níveis de expressão relativa do mRNA de Mad2 obtidos por qRT-PCR, nas culturas controle e após transfeção (48h, 72h, 96h e 120h). Os valores obtidos foram normalizados com os valores obtidos nas situações controle da linha celular respetiva, tendo esses valores sido estabelecidos como 1 (100%).

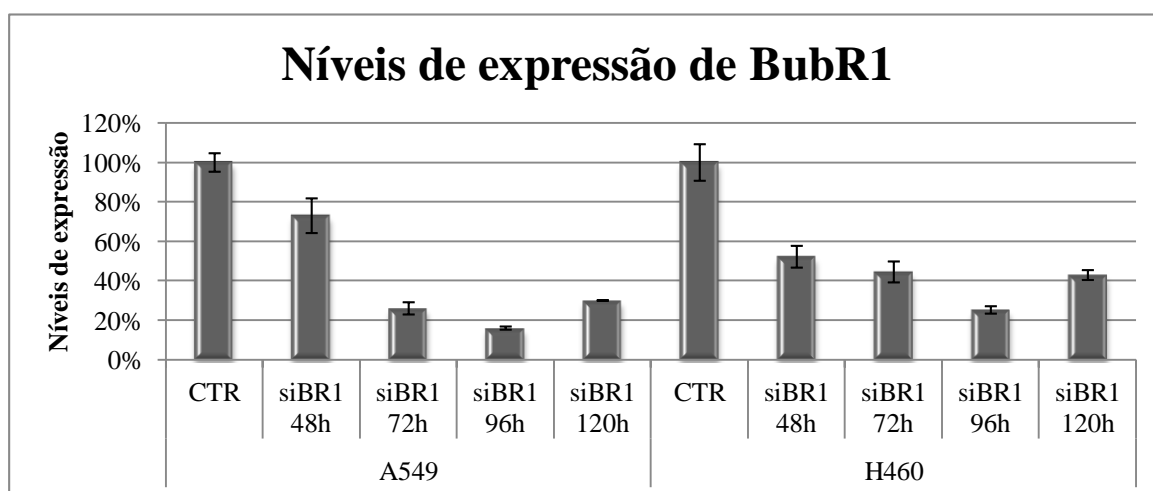


Figura 16: Eficiência da depleção da proteína BubR1 em células de CPNPC (A549 e H460), por RNAi. Níveis de expressão relativa do mRNA de BubR1, obtidos por qRT-PCR, nas culturas controle e após transfeção (48h, 72h, 96h e 120 h). Os valores obtidos foram normalizados com os valores obtidos nas situações controle da linha celular respetiva, tendo esses valores sido estabelecidos como 1 (100%).

3.2.2 Análise do fenótipo celular resultante da depleção das proteínas Mad2 e BubR1 por RNAi

Garantida a eficácia do silenciamento das proteínas Mad2 e BubR1, procedeu-se ao estudo, por imunofluorescência, do fenótipo resultante da depleção. As células transfetadas com os siRNAs (siMad2 e siBubR1) exibem um fenótipo típico de desalinhamento, caracterizado pela presença de uma placa metafásica inacabada, com um ou vários cromossomas desalinhados (Figuras 17 e 18). Assiste-se a saídas prematuras da mitose, resultantes da ausência das proteínas Mad2 e BubR1 e das funções por estas desempenhadas no *checkpoint* mitótico, com consequente má segregação cromossômica durante a anafase. Os núcleos das células interfásicas são disformes, relativamente às células controlo que apresentavam núcleos de tamanho e forma regulares.

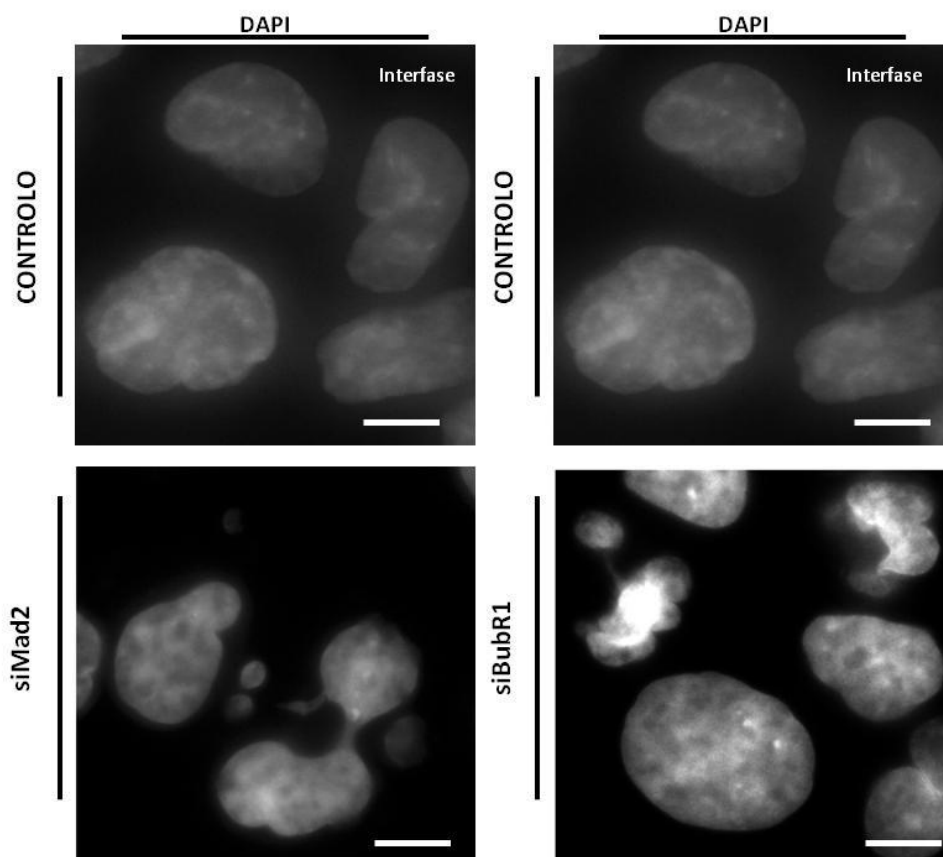


Figura 17: Fenótipo celular resultante da depleção das proteínas Mad2 e BubR1 por RNAi, em células A549. Imagens de imunofluorescência de células A549 controlo e transfetadas com siMad2 e siBubR1. O DNA foi marcado com DAPI. Barra = 5µm.

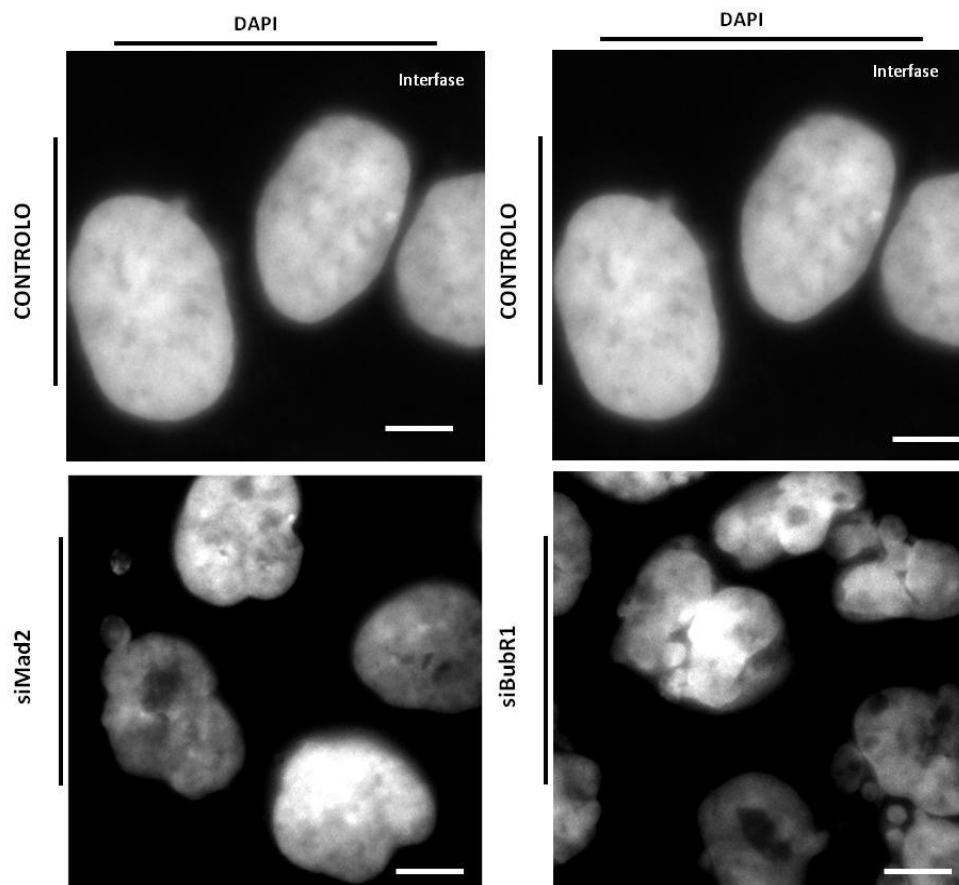


Figura 18: Fenótipo celular resultante da depleção das proteínas Mad2 e BubR1 por RNAi, em células H460. Imagens de imunofluorescência de células H460 controlo e transfetadas com siMad2 e siBubR1. O DNA foi marcado com DAPI. Barra = 5µm.

3.3 Estudos de viabilidade / proliferação das células após silenciamento de Mad2 e BubR1

De forma a avaliar o efeito do RNAi de Mad2 e BubR1 sobre a viabilidade e proliferação celular das linhas em estudo, procedeu-se ao ensaio do MTT. Este ensaio consiste na avaliação da atividade metabólica das células através da quantificação da redução metabólica do MTT pelas desidrogenases associadas ao NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) e ao NADH (nicotinamida adenina dinucleótido hidreto), o que resulta na produção de cristais de formazano, intensamente corados, no interior das células, que podem ser extraídos e dissolvidos com solventes orgânicos, permitindo a sua quantificação através de espectrofotometria (Carmichael, DeGraff et al. 1987).

Este ensaio foi realizado em três experiências independentes, com 8 réplicas para cada situação (controles positivo e negativo, e situações experimentais - transfeção com siMad2 e siBubR1 durante 48h, 72h, 96h e 120h). O controlo negativo foi obtido através da incubação da cultura celular com H₂O₂. Os resultados apresentados (Figuras 19 e 20) correspondem à média \pm desvio padrão, n=3.

Os valores da taxa de proliferação foram expressos em percentagem relativamente à absorvância determinada nas células controlo. A média dos valores de absorvância obtidos para a situação controlo é equiparada a 100% e cada um dos valores de absorvância obtidos para as restantes situações experimentais é convertido na forma de percentagem em relação à situação controlo, tendo em conta a contribuição da matriz. Resumindo, os valores de taxa de proliferação foram obtidos segundo a seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de proliferação (\%)} = (\Lambda \text{ situação experimental} \times 100) / (\Lambda \text{ controlo positivo} - \Lambda \text{ controlo negativo})$$

Λ : absorvância

Na Figura 19, estão apresentadas as taxas de proliferação obtidas para o oligonucleótido siMad2, nas linhas celulares em estudo (HeLa, A549 e H460). Nas células HeLa, verificou-se que, nas primeiras 48h, a taxa de proliferação já havia sido afetada ($74 \pm 6\%$) pelo efeito do siMad2, tendo atingido uma severa diminuição nas 24h seguintes ($36 \pm 5\%$). Às 96h, a taxa de proliferação atingiu valores inferiores ($15 \pm 4\%$) decorrentes do efeito continuado do silenciamento de Mad2. Às 120h, deu-se uma ligeira subida ($25 \pm 4\%$), muito provavelmente derivada da proliferação de células que não haviam sido transfetadas. Por sua vez, na linha celular A549, o silenciamento da proteína Mad2 demonstrou ter um efeito mais tardio na taxa de proliferação destas células, tendo evidenciado valores de $91 \pm 7\%$ ao fim de 48h e $61 \pm 5\%$ ao fim de 72h. Tal efeito poderá dever-se à presença de algum mecanismo de resistência ou a uma baixa taxa de transfeção nas experiências realizadas. Não obstante de tais factos, ao fim de 120h havia sido atingido uma taxa de $24 \pm 4\%$, o que demonstra que muito provavelmente o siRNA havia surtido o seu efeito, apesar de ter sido menos drástico nas primeiras 48h de análise. No caso da linha celular H460, os valores obtidos para o silenciamento de Mad2 evidenciaram a mesma tendência que a obtida para a linha celular A549, tendo a taxa de proliferação diminuído de $89 \pm 5\%$ às 48h para $28 \pm 3\%$ às 120h. Tal similaridade de efeitos poderá derivar das características inerentes à origem histológica partilhada por ambas as linhas.

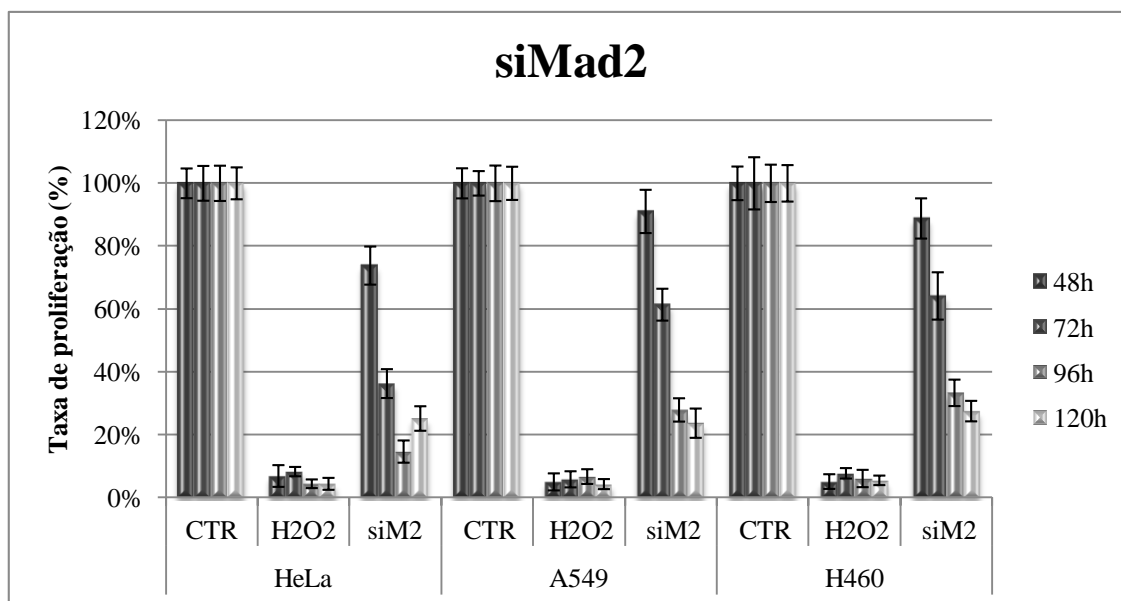


Figura 19: Efeito da exposição do siMad2 na redução do MTT pelas linhas HeLa, A549 e H460. Os dados apresentados representam as médias de três ensaios independentes.

Na Figura 20, encontram-se representadas as taxas de proliferação das três linhas celulares em estudo com o oligonucleótido siBubR1. Nas células HeLa, a taxa de proliferação celular após 48h de exposição é afetada ($86 \pm 7\%$) de uma forma menos expressiva que a obtida com o siMad2. Contudo, ao longo do tempo de exposição, verificou-se uma diminuição mais considerável da viabilidade celular, tendo atingido valores de $36 \pm 7\%$ às 120h de exposição. De igual forma, nas células A549 verificou-se uma elevada taxa de proliferação celular às 48h de exposição ($90 \pm 5\%$), seguida de uma diminuição mais acentuada a tempos de exposição superiores ($47 \pm 3\%$ às 96h e $48 \pm 5\%$ às 120h). Por sua vez, as células H460 demonstraram uma taxa de proliferação elevada às 48h ($96 \pm 5\%$) de exposição ao siBubR1, demonstrando um efeito tardio do oligonucleótido utilizado. Contudo, nos tempos de exposição subsequentes, demonstraram efeitos semelhantes às células A549, com taxas de proliferação de $47 \pm 5\%$ e $52 \pm 6\%$ às 96h e 120h, respetivamente.

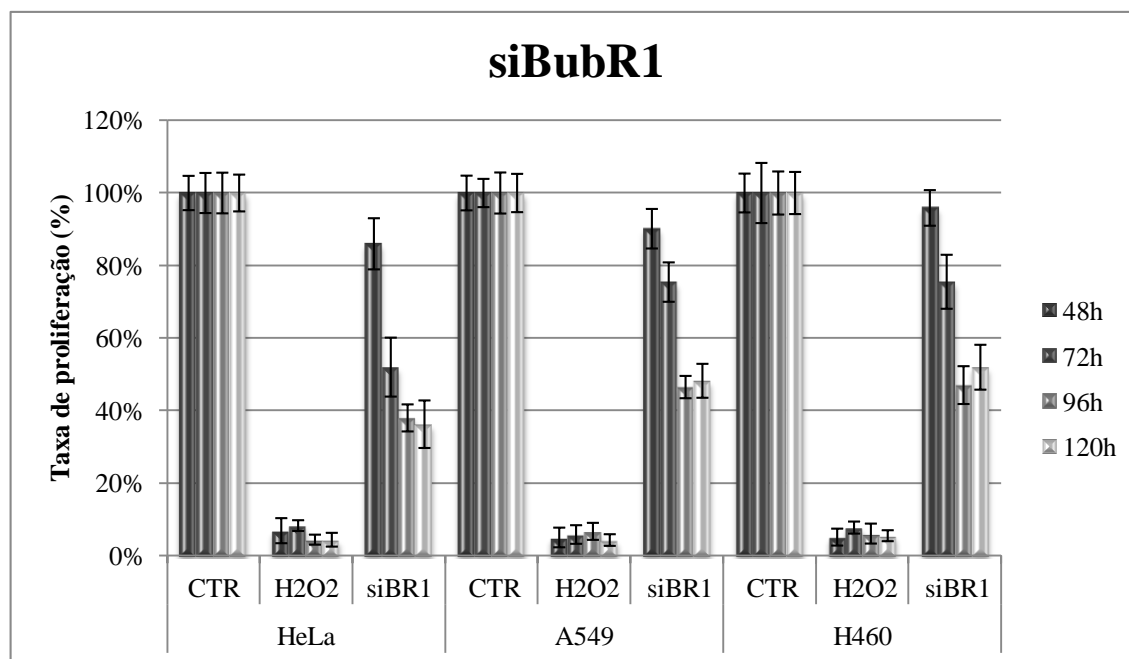


Figura 20: Efeito da exposição do siBubR1 na redução do MTT pelas linhas HeLa, A549 e H460. Os dados apresentados representam as médias de três ensaios independentes.

Todavia, os resultados obtidos mostram que o silenciamento com siBubR1 não afetou tão severamente a taxa de proliferação como o siMad2. Contudo, em trabalhos anteriormente realizados no mesmo grupo de investigação, tal silenciamento esteve associado a efeitos tão pronunciados como os obtidos para Mad2, pelo que tal ocorrência poderá derivar do facto de se estar a utilizar uma sequência de oligonucleótidos ligeiramente diferente, que poderá levar a um silenciamento não tão eficiente como o obtido no passado.

Em conclusão, a inibição do checkpoint mitótico após silenciamento de Mad2 ou BubR1 resulta numa inibição da proliferação celular das linhas A549 e H460, provavelmente devido às saídas precoces de mitose, que culminam em morte celular. Estes resultados indicam que o *checkpoint* mitótico poderá ser um alvo para interferir com a proliferação das células do CPNPC.

3.4 Eficiência do checkpoint mitótico nas linhas celulares de CPNPC

Uma vez que vários tipos de cancro apresentam um *checkpoint* mitótico deficiente, estando essa deficiência associada à aneuploidia neles verificada, o presente estudo foi também alargado à avaliação da sua eficiência nas linhas de CPNPC em análise, após incubação com nocodazole.

O nocodazole é um fármaco que impede a formação do fuso mitótico pela sua capacidade de despolimerizar os microtúbulos, provocando a paragem do ciclo celular na fase G2/M, como resposta da célula à ativação do *checkpoint mitótico*. Na presença de nocodazole, as linhas celulares com *checkpoint* mitótico eficiente são capazes de bloquear em mitose, verificando-se assim a acumulação de células mitóticas na cultura. Por sua vez, nas linhas celulares com *checkpoint* mitótico pouco eficiente, as células progridem para a divisão celular, mesmo na ausência dos requisitos para esse efeito, não se verificando acumulação de células em mitose (Shi, Orth et al. 2008).

Assim, de forma a avaliar a eficiência do *checkpoint* mitótico das linhas celulares estudadas (A549 e H460), procedeu-se à incubação (durante 16h) das células na presença e na ausência (situação controlo) de nocodazole, e posterior quantificação do número total de células (mitóticas e interfásicas). As células HeLa foram utilizadas como controlo, uma vez que possuem um *checkpoint* mitótico eficiente. Esta experiência foi repetida três vezes, de forma independente.

Na Figura 21 estão representados os valores de IM obtidos. Analisando as situações controlo, todas as linhas apresentam valores de IM baixos (HeLa: $6,50\% \pm 0,5$; H460: $6,53\% \pm 0,3$; A549 $4,60\% \pm 0,46$), o que significa que, na ausência de nocodazole, as células progridem normalmente no ciclo celular. Por sua vez, nas situações teste, nas quais se adicionou nocodazole, verificou-se a acumulação das células em mitose (HeLa: $80,06\% \pm 7,09$; H460: $82,60\% \pm 12,57$; A549 $68,48\% \pm 0,82$), demonstrando a eficiência do *checkpoint* mitótico das linhas celulares em estudo.

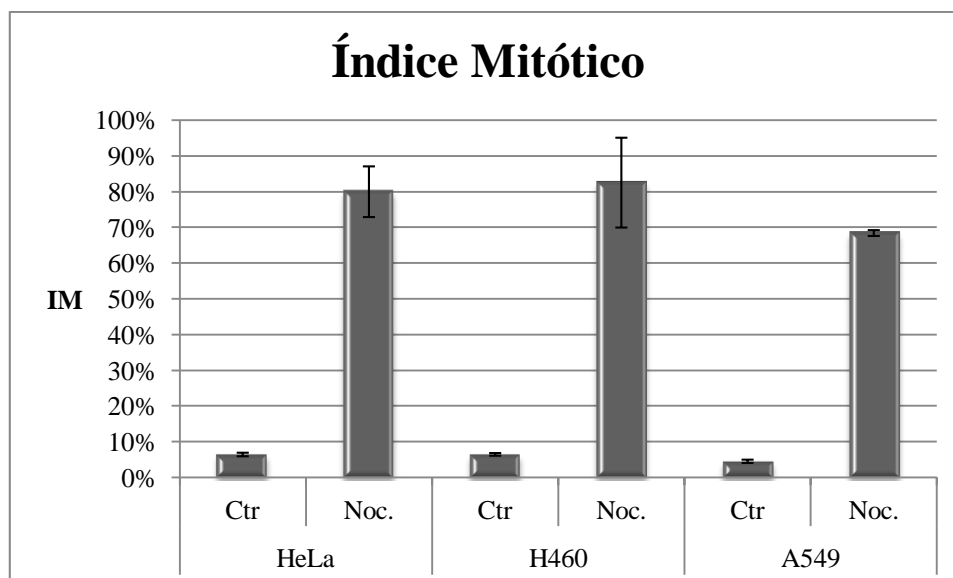


Figura 21: Efeito do nocodazole em culturas celulares, ao longo de 16h de incubação. IM ao fim de 16h em culturas de HeLa, H460 e A549 na presença e ausência de nocodazole. Os valores de IM provêm da análise das culturas por microscopia de contraste de fase. Os valores representam a média aritmética \pm desvio padrão dos valores obtidos de três experiências, analisadas independentemente.

Capítulo IV: Conclusão

Neste trabalho propusemo-nos interferir com a expressão dos genes codificantes das proteínas Mad2 e BubR1 em linhas tumorais de CPNPC (linhas celulares A549 e H460) usando sequências de siRNAs encapsulados em nanopartículas de quitosano, de forma a verificar se o silenciamento dos genes Mad2 e BubR1 interfere com a sobrevivência e proliferação dessas linhas tumorais.

Numa primeira fase, propusemo-nos verificar se o silenciamento dos genes Mad2 e BubR1 interferia com a sobrevivência e proliferação de linhas tumorais de CPNPC (linhas A549 e H460) usando sequências de siMad2 e siBubR1, e validar essas sequências de siRNA como agentes terapêuticos contra o CPNPC. Numa segunda fase, propusemo-nos administrar esses mesmos siRNAs encapsulados em nanopartículas de quitosano, e verificar se o silenciamento dos genes Mad2 e BubR1 interfere com a sobrevivência e proliferação dessas linhas tumorais. Devido à escassez de tempo disponível, não foi possível a abordagem da segunda fase do projeto a que nos propusemos, sendo que apenas nos foi possível a abordagem e cumprimentos dos objetivos estabelecidos na primeira, referentes à validação das sequências de siRNAs utilizadas nas linhas de CPNPC.

Assim, da análise dos resultados resultantes da abordagem realizada, podemos verificar que foi possível: otimizar as sequências de oligonucleótidos siMad2 e siBubR1, tendo sido possível demonstrar, em células HeLa, a eficiência desses oligonucleótidos no silenciamento das proteínas Mad2 e BubR1, pela obtenção do fenótipo celular esperado; verificar que os oligonucleótidos siMad2 e siBubR1 utilizados são eficazes no silenciamento das proteínas Mad2 e BubR1 em células de CPNPC, A549 e H460. Tendo em consideração o papel que ambas as proteínas (Mad2 e BubR1) desempenham no *checkpoint* mitótico, podemos afirmar que as alterações verificadas ao nível da expressão dessas proteínas, pelo seu silenciamento pela técnica de RNAi, poderão comprometer as suas respectivas funções e, conseqüentemente, levar a mitoses catastróficas (com uma segregação cromossômica incorreta), comprometendo assim a proliferação das células CPNPC, e representando assim um potencial alvo terapêutico para o tratamento desta neoplasia.

Capítulo V: Perspectivas Futuras

Os resultados obtidos neste estudo são preliminares, pelo que deverão ser complementados em linhas celulares primárias do pulmão, de forma a comparar e validar os resultados conseguidos e permitir uma comparação dos resultados obtidos. Paralelamente, deve realizar-se também uma avaliação num conjunto maior de linhas celulares de CPNPC, representativas dos diferentes tipos histológicos, de forma a aumentar a abrangência do estudo.

Futuramente, deverá complementar-se este estudo com a administração dos siRNAs testados, encapsulados em nanopartículas de quitosano. Para tal, a estratégia passará por: testar várias formulações de quitosano, de forma a avaliar as melhores características físico-químicas para reagir com os oligonucleótidos de siRNAs utilizados; interferir com a expressão dos genes das proteínas do *checkpoint* mitótico Mad2 e Bub1 utilizando os siRNAs encapsulados com as nanopartículas de quitosano testadas.

Capítulo VII: Bibliografía

- Alberg, A. J. and J. M. Samet (2003). "Epidemiology of Lung Cancer." Chest **123**: 21S - 49S.
- Ashfaq, U. A., M. Z. Yousaf, et al. (2011). "siRNAs: Potential therapeutic agents against Hepatitis C Virus." Virology Journal **8**: 276.
- Asnaghi, L., W. Vass, et al. (2010). "E-cadherin negatively regulates neoplastic growth in non-small cell lung cancer: role of Rho GTPases." Oncogene **29**: 2760-2771.
- Barbosa, J., A. V. Nascimento, et al. (2011). "The spindle assembly checkpoint: perspectives in tumorigenesis and cancer therapy." Front. Biol. **6**(2): 147-155.
- Bharadwaj, R. and H. Yu (2004). "The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer." Oncogene **23**: 2016-2027.
- Bumcrot, D., M. Manoharan, et al. (2006). "RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs." Nature Chemical Biology **2**(12): 711-719.
- Carmichael, J., W. G. DeGraff, et al. (1987). "Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing." Cancer Res. **47**: 936-942.
- Chan, G. K. T., S. A. Jablonski, et al. (1999). "Human BUBR1 Is a Mitotic Checkpoint Kinase that Monitors CENP-E Functions at Kinetochores and Binds the Cyclosome/APC." The Journal of Cell Biology **146**(5): 941-954.
- Cheeseman, I. M. and A. Desai (2008). "Molecular architecture of the kinetochore–microtubule interface." Molecular Cell Biology **9**: 33-43.
- Cheng, C. J. and W. M. Saltzman (2011). "Enhanced siRNA delivery into cells by exploiting the synergy between targeting ligands and cell-penetrating peptides." Biomaterials **32**: 6194-6203.
- Choi, E. J., Y. K. Ryu, et al. (2010). "Targeting Epidermal Growth Factor Receptor-Associated Signaling Pathways in Non -Small Cell Lung Cancer Cells: Implication in Radiation ResponseCancer Cells:." Mol Cancer Res **2010**(8): 1027-1036.
- Ciliberto, A. and J. V. Shah (2009). "A quantitative Systems view of the spindle assembly checkpoint." EMBO journal **28**(15): 2162-2172.
- Clarke, D. J. and J. F. Gimenez-Abian (2000). "Checkpoints controlling mitosis." Bioessays **22**(4): 351-363.

- Clarke, D. J. and J. F. Giménez-Abián (2000). "Checkpoints controlling mitosis." BioEssays **22**: 351-363.
- Cowell, J. K. (2001). Histologic types of lung cancer. Molecular Genetics of Cancer. J. K. Cowell. Oxford, BIOS Scientific Publishers Ltd: 388 - 390.
- D'Angiolella, V., C. Mari, et al. (2003). "The spindle checkpoint requires cyclin-dependent kinase activity." Genes & Development **17**: 2520-2525.
- Davis, M. E., J. E. Zuckerman, et al. (2010). "Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles." Nature **464**: 1067-1071.
- Fang, G. (2002). "Checkpoint Protein BubR1 Acts Synergistically with Mad2 to Inhibit Anaphase-promoting Complex." Molecular Biology of the Cell **13**: 755-766.
- Ferreira, M. N. and M. O. Correia (2005). Ciclo Celular. Biologia Celular e Molecular. L. LIDEL - Edições Técnicas, LIDEL - Edições Técnicas, Lda.
- Gao, Y., X.-L. Liu, et al. (2011). "Research progress on siRNA delivery with nonviral carriers." International Journal of Nanomedicine **6**: 1017-1025.
- Globocan. (2008). "Section of Cancer Information (19/4/2011) " Retrieved IARC.
- Grzelakowska-Sztabert, B. (2004). "Cell cycle checkpoints -- molecular background." Folia Morphol (Warsz) **63**(1): 1-3.
- Hoag, J. B., A. Azizi, et al. (2009). "Association of cetuximab with adverse pulmonary events in cancer patients: a comprehensive review." Journal of Experimental & Clinical Cancer Research **28**: 113.
- Howard, K. A., U. L. Rahbek, et al. (2006). "RNA Interference in Vitro and in Vivo Using a Chitosan/siRNA Nanoparticle System." Molecular Therapy **14**(4): 476-484.
- Hwang, L. H., L. F. Lau, et al. (1998). "Budding Yeast Cdc20: A Target of the Spindle Checkpoint." Science **279**: 1041-1044.
- Institute, N. C. (2008). Non-small cell lung and bronchus cancer (invasive) survival rates, by race, sex, diagnosis year, state and age. SEER Cancer Statistics Review 1975–2004 MD, USA National Cancer Institute.
- Kang, J. and H. Yu (2009). "Kinase Signaling in the Spindle Checkpoint." Journal of Biological Chemistry **284**(23): 15359-15363.

- Kaufmann, W. K. and R. S. Paules (1996). "DNA damage and cell cycle checkpoints." FASEB J **10**(2): 238-247.
- Lam, J. K.-W., W. Liang, et al. (2011). "Pulmonary delivery of therapeutic siRNA." Advanced Drug Delivery Reviews *in press*.
- Lee, M. W., D. S. Kim, et al. (2008). "Akt1 inhibition by RNA interference sensitizes human non-small cell lung cancer cells to cisplatin." Int. J. Cancer **122**: 2380-2384.
- Lieberman, J., E. Song, et al. (2003). "Interfering with disease: opportunities and roadblocks to harnessing RNA interference." Molecular Medicine **9** (9): 397403.
- Lodish, H., A. Berk, et al. (2000). Molecular Cell Biology. W. H. F. a. Company. New York, W. H. Freeman and Company.
- Logarinho, E. and H. Bousbaa (2008). "Kinetochore-microtubule interactions "in check" by Bub1, Bub3 and BubR1: The dual task of attaching and signalling." Cell Cycle **7**(12): 1763-1768.
- Malumbres, M. and M. Barbacid (2001). "To Cycle or Not to Cycle: A Critical Decision in CCancer." Nature Reviews **1**: 222-231.
- Mao, S., W. Sun, et al. (2010). "Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA." Advanced Drug Delivery Reviews **62**: 12-27.
- Martin-Lluesma, S., V. M. Stucke, et al. (2002). "Role of Hec1 in Spindle Checkpoint Signaling and Kinetochore Recruitment of Mad1/Mad2." Science **297**: 2267-2270.
- McGowan, C. H. (2003). "Regulation of the eukaryotic cell cycle." Prog Cell Cycle Res **5**: 1-4.
- Meister, G. and T. Tuschl (2004). "Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA." Nature **431**: 343-349.
- Mitsudomi, T. (2010). "Advances in Target Therapy for Lung Cancer." Jpn J Clin Oncol **40**(2): 101-106.
- Molina, J. R., P. Yang, et al. (2008). "Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors. Treatment, and Survivorship." Mayo Clin Proc. **83**(5): 584-594.
- Morgan, D. O. (2007). The Cell Cycle: Principles of Control. E. Lawrence. London, New Science Press Ltd.
- Murray, A. W. (2004). "Recycling the Cell Cycle: Cyclins Revisited." Cell Cycle **116**: 221-234.

- Musacchio, A. and E. D. Salmon (2007). "The spindle-assembly checkpoint in space and time." Molecular Cell Biology **8**: 379-391.
- Nagpal, K., S. K. Singh, et al. (2010). "Chitosan Nanoparticles: A Promising System in Novel Drug Delivery." Chem. Pharm. Bull. **58**(11): 1423-1430.
- Oh, Y.-K. and T. G. Park (2009). "siRNA delivery systems for cancer treatment." Advanced Drug Delivery Reviews **61**: 850-862.
- Orr, B., H. Bousbaa, et al. (2007). "Mad2-independent spindle assembly checkpoint activation and controlled metaphase-anaphase transition in *Drosophila* S2 cells." Mol Biol Cell **18**(3): 850-863.
- Parente, B., H. Queiroga, et al. (2007). "Estudo epidemiológico do cancro do pulmão em Portugal nos anos de 2000/2002." Revista Portuguesa de Pneumologia **XIII**(2): 255-265.
- Powers, A. F., A. D. Franck, et al. (2009). "The Ndc80 kinetochore complex uses biased diffusion to couple chromosomes to dynamic microtubule tips." Cell. **136**(5): 865-875.
- Ray, M., R. Salgia, et al. (2009). "The Role of EGFR Inhibition in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer." The Oncologist **14**: 1116-1130.
- Reade, C. A. and A. K. Ganti (2009). "EGFR targeted therapy in non-small cell lung cancer: potential role of cetuximab." Biologics: Targets & Therapy **3**: 215-224.
- Schafer, K. A. (1998). "The Cell Cycle: A Review." Vet Pathol **35**: 461-478.
- Schiffelers, R. M., A. Ansari, et al. (2004). "Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle." Nucleic Acids Research **32**(19): 1-10.
- Shi, J., J. D. Orth, et al. (2008). "Cell Type Variation in Responses to Antimitotic Drugs that Target Microtubules and Kinesin-5." Cancer Res **68**: 3269-3276.
- Silva, P., J. Barbosa, et al. (2011). "Monitoring the fidelity of mitotic chromosome segregation by the spindle assembly checkpoint." Cell Prolif. **44**: 391-400.
- Smith, A. P. L., J. F. Giménez-Abián, et al. (2002). "DNA-Damage-Independent Checkpoints: Yeast and Higher Eukaryotes." Cell Cycle **1**: 16-33.
- Society, A. C. (2011). Cancer Facts & Figures 2011. Atlanta, American Cancer Society.

- Spiro, S. G., N. T. Tanner, et al. (2010). "Lung cancer: Progress in diagnosis, staging and therapy." Respirology **15**: 44–50.
- Stinchcombe, T. E. and M. A. Socinski (2009). "Current Treatments for Advanced Stage Non-Small Cell Lung Cancer." Proc Am Thorac Soc **6**: 233-241.
- Suijkerbuijk, S. J. E. and G. J. P. L. Kops (2008). "Preventing aneuploidy: The contribution of mitotic checkpoint proteins." Biochimica et Biophysica Acta.
- Takahashi-Yanaga, F. and T. Sasaguri (2008). "GSK-3 β regulates cyclin D1 expression: A new target for chemotherapy." Cellular Signalling **20**: 581-589.
- Tavaria, F. K., J. Fernandes, et al. (2011). Biological Activities of Chitin, Chitosan and Respective Oligomers. Focus on Chitosan Research. A. N. Ferguson and A. G. O'Neill, Nova Science Publishers, Inc.
- Taylor, S. S., M. I. F. Scott, et al. (2004). "The spindle checkpoint: a quality control mechanism which ensures accurate chromosome segregation." Chromosome Research **12**: 599-616.
- Vermeulen, K., D. R. V. Bockstaele, et al. (2003). "The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer." Cell Prolif. **36**(131-149).
- Vermeulen, K., D. R. Van Bockstaele, et al. (2003). "The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer." Cell Prolif **36**(3): 131-149.
- Wang, J. J., Z. W. Zeng, et al. (2011). "Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers." International Journal of Nanomedicine **6**: 765-774.
- Yang, C. T., J. M. Li, et al. (2010). "Adenovirus-mediated transfer of siRNA against survivin enhances the radiosensitivity of human non-small cell lung cancer cells." Cancer Gene Ther **17**(2): 120-130.
- Zhang, M., X. Zhang, et al. (2004). "Inhibition of epidermal growth factor receptor expression by RNA interference in A549 cells." Acta Pharmacol Sin **25**(1): 61-67.